



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MEXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
SALUD ANIMAL**

**ADAPTACIÓN DEL FENOTIPO DEL MUSCULO DEL  
POLLO DE ENGORDA TRATADO CON CARAZOLOL**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**MVZ AGUSTIN NIETO CARMONA**

**TUTORES:**

**LUIS OCAMPO CAMBEROS  
EUGENIO QUIROZ ROTHE**

**COMITÉ TUTORAL**

**TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SANCHEZ**

**MEXICO, D. F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DEDICATORIA:**

**A Dios:** Por permitirme vivir y conocer todas las cosas ya vividas hasta hoy y las que vienen.

**A mis Padres: Blanca Estela Carmona de Nieto y Elias Nieto Ortega,** quienes me dieron la vida y me han guiado por esta, por mantener a la familia unida en las buenas y en las malas, por todo el amor, cariño y paciencia, gracias.

**A mis hermanos: Francisco Manuel y Eduardo** quienes son una parte fundamental en mi vida.

**A la L. C. C. Rocio Hernández Flores** quien ha decidido unir su vida a la mía, por todo su apoyo y amor incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis Tutores los Doctores:**

**Luis Ocampo Camberos, Eugenio Quiroz Rothe, Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez,** por su apoyo, guía y enseñanza.

Al laboratorio **Schütze Seegen SA** de CV (**Dr. Jorge Luengo Creel**) por el apoyo y financiamiento para la realización de este proyecto.

**Al departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ –UNAM C.U.** en especial a los doctores **Lilia Gutiérrez Olvera, Héctor Sumano López.** Por su amistad y guía.

Al departamento de **Técnicas Histológicas de la Fac. de Medicina de la UNAM.** A las Técnicas **Verónica Rodríguez Mata** y **Judith Reyes Ruiz**

Al doctor **Pedro Ochoa Galván** del depto. de Genética y Bioestadística de la FMVZ.

**Al Pentatlón Deportivo Militarizado Universitario,** en especial a la **subzona Azcapotzalco,** por la gran contribución para formarme y alcanzar mis metas

**A la escuela de artes marciales Seika No Itten** del profesor **Ricardo Hernández,** por enseñarme que lo único que me limita soy yo mismo.

A mis amigos y compañeros de la maestría en especial a los M en C. **Sayuri Hayashida, Jeny Aguilar y Moisés Valderrama.**

A mis Amigos de toda la vida: **Adrian, Ubaldo, Leonardo, Nancy, Maria Luisa, Teresa, Jose Antonio** que aun en la distancia sabemos que siempre, estamos para el que nos necesita.

A mis hermanos de karate:, **así como a todos mis alumnos.**

A todos aquellos que me brindaron su ayuda, a los que quisieron y no pudieron, a los que pudieron y no quisieron, gracias.

## **INDICE**

---

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**LISTA DE CUADROS**

**LISTA DE IMAGENES**

**PRIMERA PARTE**

**I. INTRODUCCION**

**II. BASES MORFOLOGICAS DEL MUSCULO ESQUELETICO**

**II.A. Población miofibrilar**

**II.B. Morfometría fibrilar**

**II.C. Perfil metabólico miofibrilar**

**II.D. Características de las fibras musculares del pollo de engorda**

**II.E. Relación entre las características fibrilares y calidad de carne en el pollo de engorda**

**II.F. Manejo de las biopsias musculares**

**III. BASE DEL ANÁLISIS DE IMÁGENES**

**IV. GENERALIDADES DE LOS FARMACOS BETA BLOQUEADORES**

**IV.A. Características del Carazolol**

**SEGUNDA PARTE**

## **I. JUSTIFICACIÓN**

## **II. HIPÓTESIS**

## **III. OBJETIVO GENERAL**

### **III.A.OBJETIVOS PARTICULARES**

## **IV. MATERIALES Y METODO**

### **IV.A. Animales**

### **IV.B. Manejo de biopsias musculares**

### **IV.C. Técnicas histológicas e histoquímicas**

### **IV.D. Digitalización y análisis de imágenes**

### **IV. E. Análisis estadístico**

## **V. RESULTADOS**

### **V. A. Músculo femoral**

### **V. B. Músculo pectoral**

## **VI. DISCUSION**

## **VII. CONCLUSION**

## **VIII. BIBLIOGRAFIA**

## RESUMEN

El objetivo general de este trabajo ha sido conocer la adaptación del fenotipo muscular después de la administración oral del carazolol a pollos de engorda. Las conclusiones pretenden sentar las bases para utilizar este fármaco en esta especie animal. Este bloqueador agonista beta 3 adrenérgico tiene entre sus efectos una eficaz inhibición de la acción de las catecolaminas sobre las fibras musculares esqueléticas liberadas durante el estrés de transporte en cerdos y bovinos. Esta acción reduce el deterioro en la calidad de la canal. La dosis recomendada es de 1mg / 100 kg (cerdos y bovinos) por vía intramuscular sin embargo la biodisponibilidad por vía oral es de aproximadamente del 10 % requiriendo 10 veces más la dosis. Su acción incluye la disminución de la taquicardia y gasto cardíaco evita la hipertermia, previene la acidosis metabólica, inhibe la movilización de grasas evitando su acumulación a nivel hepático. Se utilizaron 2 grupos de pollos de la línea Ross; grupo control (n=5) y grupo tratado (n= 10), de cuatro semanas de edad, dándose una semana de adaptación, al inicio de la quinta semana se administró V.O. una dosis única de 100 µg/kg. Se sacrificaron con sobredosis intramuscular de ketamina, en la pechuga a las 2 (n=3), 4 (n=3) y 8 días (n= 4) pos tratamiento del grupo tratado y 0 (n=2) y 8 (n=3) días del grupo control, tomándose muestras de los musculos femorales y pectorales e inmediatamente congelándose en nitrógeno líquido para su análisis, se realizaron cortes transversales seriados de 10µ de grosor y se realizaron las tinciones de hematoxilina – eosina, Acido Periódico de Schiff (PAS), Succinil Deshidrogenada (SDH), Glicerol fosfato deshidrogenada (GPDH), α- amilasa PAS y miosín ATPása con una pre incubación ácida. Se digitalizaron a un aumento de 10x y se analizaron las imágenes con el programa Image Pro Plus®. Las observaciones obtenidas se analizaron con el programa estadístico SAS obteniendo diferencias significativas en la morfología y metabolismo celular con una P<0.05 entre los 2 y 4 días postratamiento en relación al grupo control en cuanto densidad capilar, area transversal, SDH, GPDH y Glucógeno intrafibrilar (PAS).

Palabras clave: Carazolol, metabolismo muscular, SDH, GPDH, beta-agonista, adrenoreceptores, morfología muscular, musculo esquelético.

---

## ABSTRACT

The aim of this work was to establish the muscle phenotype adaptation after the oral administration of carazolol to poultry in order to provide evidence for further use of this drug in this animal species. One of this beta-adrenergic blocking agent activities, is the effective inhibition of the action of released catecholamines on skeletal muscle fibers during stressful situations such as transport of swine and cattle. This action reduces injury and therefore increases meat quality. Recommended dose is 1 mg/100 kg (swine and cattle) by intramuscular administration. Nevertheless, bioavailability *per os* is of approximately 10%, requiring a 10-fold increase in dosage. It reduces tachycardia and cardiac output, inhibits hyperthermia, prevents metabolic acidosis, and inhibits fat mobilization by avoiding their hepatic accumulation. Two groups of chickens of the Ross breed were used: Controls (n=5) and experimental animals (n=10) were four-weeks old and allowed to adapt during one week. At the beginning of the fifth week, a single dose of 100 µg/kg was administered *per os*. Experimental animals were humanely euthanized applying an intramuscular overdose of ketamine in the breast muscle at 2 (n=3), 4 (n=3), and 8 (n=4) days after treatment; whereas untreated controls were euthanized at days 0 (n=2) and 8 (n=3). Samples were collected from femoral and breast muscles and were immediately frozen in liquid nitrogen for further analysis. Transverse sections of 10µ were cut and stained with hematoxylin and eosin, periodi-acid Schiff (PAS), Succinyl dehydrogenase (SDH), glycerol phosphate dehydrogenase (GPDH), α-amylase PAS and myosin ATPase with an acid pre-incubation. Tissue sections were digitalized at 10X and analyzed using Image Pro Plus® software. Observed results were analyzed using the statistical program SAS and statistical differences were obtained in morphology and cellular metabolism with a P<0.05 between 2 and 4 days after treatment as compared to controls regarding capillary density, transverse area, SDH, GPDH, and intrafibrillar glucogen (PAS).

Keywords: Carazolol, muscular metabolism, SDH, GPDH, beta-agonist, adrenoreceptors, muscular morphology, skeletal muscle.

---

## **LISTA DE CUADROS:**

1. Características principales de los diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas.
2. Comparativos de los diferentes tipos de fibras musculares en el pollo.
3. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo I del músculo femoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4, D8).
4. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo IIA del músculo femoral del pollo del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4, D8).
5. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo IIB del músculo femoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4, D8).
6. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo I del músculo pectoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4).
7. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo IIA del músculo pectoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4).
8. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo IIB del músculo pectoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4).

## LISTA DE FIGURAS:

1. Organización del músculo esquelético.
2. a) Fotografía de las bandas claras y oscuras de un músculo esquelético. B) Tinción H y E se observan las fibras transversales y núcleos.
3. a) ATPasa (4,4). b) Succinil deshidrogenasa.
4. Fórmula estructural del carazolol.
5. Fórmula estructural de las principales catecolaminas.
6. Imágenes de microscopía óptica a 10 x, de las diferentes tinciones histológicas e histoquímicas de biopsias musculares del pollo de engorda tratado con carazolol. hematoxilina- eosina H-E,
7. Ácido peryódico de Schiff PAS
8.  $\alpha$  amilasa- PAS
9. 3Glicerofosfato deshidrogenasa GPDH;
10. Succinil deshidrogenasa SDH;
11. Miosin ATPásica/ pre incubación ácida.
12. Promedios de tipos fibrilares en el músculo femoral de pollos en el Grupo control (D0) y grupo tratado (D2, D4 y D8)
13. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).
14. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).
15. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).
16. Promedios de la actividad glucolítica Do (GPDH) de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8)
17. Promedios de la actividad oxidativa Do (SDH) de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).
18. Promedios del contenido intrafibrilar de glucógeno Do (PAS) de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8)
19. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo II A del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).

20. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).
21. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).
22. Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).
23. Promedios de la actividad oxidativa de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).
24. Promedios de la concentración intrafibrilar de glucógeno Do de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).
25. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo II B del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8)
26. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8)
27. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).
28. Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8)
29. Promedios de la actividad oxidativa de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).
30. Promedios de la concentración intrafibrilar de glucógeno Do de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8)
31. Promedios de tipos fibrilares en el músculo pectoral de pollos en el Grupo control (D0) y grupo tratado D2 y D4).
32. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).
33. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4)
34. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).
35. Promedios de la actividad glucolítica Do (GPDH) de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).
36. Promedios de la actividad oxidativa Do (SDH) de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4)
37. Promedios del contenido intrafibrilar de glucogeno Do (PAS) de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).
38. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo II A del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).

39. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
40. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
41. Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
42. Promedios de la actividad oxidativa de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
43. Promedios de la concentración intrafibrilar de glucógeno Do de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
44. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).
45. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
46. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
47. Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
48. Promedios de la actividad oxidativa de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).
49. Promedios de la concentración intrafibrilar de glucógeno Do de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).

# **PRIMERA PARTE**

## **REVISION BIBLIOGRAFICA**

## I. INTRODUCCION

---

El músculo esquelético es un tejido versátil y heterogéneo que posee una gran diversidad de células, proteínas y propiedades estructurales, metabólicas y contráctiles cuya principal característica es la adaptabilidad (Talmadge, 1993, Booth y Baldwin, 1996). El conocimiento de los mecanismos de adaptación celular del músculo esquelético frente a estímulos fisiológicos y/o patológicos permiten comprender mejor los factores que regulan la calidad de la carne (ternura, porcentaje de colágeno, grasa) (Lefaucheur y cols. 2002; Ouali y cols. 1990) teniendo por esto un enorme interés en medicina, sanidad y producción animal (López Rivero y Quiroz Rothe, 2001, Lefaucheur y cols. 2002; Andersen y cols. 2005).

El análisis histológico e histoquímico del músculo esquelético permite conocer su fenotipo y la adaptabilidad frente a estímulos fisiológicos (p.e: crecimiento, ejercicio) (Persson y cols. 1991; Belcastro y cols. 1998), dietarios y metabólicos (p.e: procesos aeróbicos, anaeróbicos) (Taylor, 1985; Talmadge, 1993; Blanco y cols. 1988; Blanco y Sieck, 1992; Dunshea y cols. 2005), genéticos (influencia de la selección en miogenesis y crecimiento muscular) (Rehfeldt, y cols. 2000; Rehfeldt, y cols. 2004) ambientales (p.e: manejo, nutrición, transporte), y/o farmacológicos (promotores del crecimiento) (Kijowski, 1997; ). La mejor adaptación muscular a estos estímulos determinará la calidad de la carne (Ashmore, 1974; Henckel, y cols. 1997) pero se debe tener también en consideración las condiciones que rodean al sacrificio (Shackelford y cols. 1999; Gunning y Hardeman, 1991).

Por lo tanto la composición ante-mortem de fibras musculares, la proporción de grasa intramuscular y de tejido conectivo están relacionados directamente con los atributos organolépticos, nutricionales e higiénicos de la carne (p.e: color, capacidad de retención de agua, ternura y cambios del pH) (Kijowski, 1997; Lefaucheur y cols. 2002). Los factores de manejo que más influyen sobre la calidad final de este producto son la edad y peso al sacrificio, cantidad y composición de la dieta, temperatura ambiental, temperatura de la canal, uso y abuso de finalizadores (López Rivero y Quiroz Rothe, 2001).

La relación entre calidad cárnica y condiciones de transporte y sacrificio (Le Bihan-Duval y cols. 1998; Le Bihan-Duval y cols. 1999; Fujii y cols. 1990) han sido relacionadas con el

síndrome de estrés aviar (SSA) (Stephan, 1993) cuya consecuencia es carne pálida, suave y exudativa (PSE) (McKee y Sams, 1997; Sosniki y Wilson, 1991). Esta condición se atribuye a un descenso importante del pH, aumento del lactato y aumento de la temperatura de la canal (Choe y cols. 2008; Ashmore.1974). Estos hechos conllevan a una merma cualitativa del producto alimentario e importante pérdida económica al sector avícola (McCurdy y cols. 1996; Barbut, 1997; Berri y cols. 2001).

La relación entre bloqueadores adrenérgicos con la producción y calidad cárnica ha sido estudiada en los últimos 20 años. Así, el bloqueador agonista beta 3 (carazolol), se ha reportado en el ganado porcino y bovino como fármaco con importantes características reductoras del estrés (Berri y cols.2004; Andersen y cols. 2005). Sin embargo a nuestro conocimiento no se ha reportado el efecto de este fármaco en el músculo esquelético del pollo de engorda.

Por lo que el objetivo general de este trabajo es conocer la heterogeneidad del fenotipo muscular (porcentaje y características contráctiles, metabólicas y morfológicas de las fibras musculares) (Pette y Staron, 1990; Talmadge y Edgerton, 1993) de la estirpe Ross frente a un agente estresor (manejo) y posteriormente comprender los mecanismos de adaptabilidad de este tejido en animales tratados con carazolol.

## **II. BASES MORFOLOGICAS DEL MUSCULO ESQUELETICO**

El músculo esquelético representa del 40 al 50% del peso corporal en los animales domésticos. De este valor, del 75 al 90 % son miofibras (Lefaucheur y cols. 2002). Los miocitos, presentan como características: doble membrana plasmática (sarcolema), varios núcleos en posición periférica y una morfología alargada, por esto se denominan “fibras musculares” (Brooke y Kaiser, 1970). Más del 90 % del tejido muscular está representado por las miofibras, mientras que el porcentaje restante corresponde a nervios, vasos sanguíneos, grasa y tejido conectivo, que separa cada una de las fibras musculares (endomisio), los fascículos (perimisio) y el músculo en su totalidad (epimisio) (Ashmore y Doerr 1971). La red neuro-vascular penetra al tejido muscular a través de los septos del tejido conjuntivo. El sarcolema se continúa con un sistema de túbulos transversales (túbulos T), relacionados con el retículo sarco-endoplásmico y la movilización de calcio (Pette, 1980; Berchtold y cols. 2000). Las fibras musculares esqueléticas se caracterizan por la presencia de miofibrillas. Estas estructuras responsables de la contracción tienen una forma

cilíndrica alargada (1 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro) y corren paralelas al eje longitudinal de la célula. En los campos transversales se observa que están agrupadas en los campos de Cohenheim (Huxley, 1971; Pette, 1980; Alberts y cols.1983). Las miofibrillas se localizan en el citoplasma fibrilar (sarcoplasma). Este contiene grandes cantidades de potasio, magnesio y fosfato, enzimas proteicas y un elevado número de mitocondrias (Reggianni y Mascarello, 2004). Las miofibrillas están formadas por **miofilamentos** finos y gruesos, los que inducen la apariencia de bandas claras y oscuras que se repiten a lo largo de cada miofibrilla, determinando la organización de los sarcómeros. Los miofilamentos se dividen en filamentos individuales, compuestos por proteínas contráctiles y no contráctiles (Karpati, 1979). La miosina es la proteína mayoritaria del músculo y el principal constituyente de su aparato contráctil. Otras proteínas miofibrilares son: actina, troponina, tropomiosina o extramiofibrilares ( $\text{Ca}^{+2}$  sarcoendoplasmática) (Schiaffino y Reggianni, 1996 Talmadge y cols. 1993, Rivero y cols. 1999). Figura 1 y 2 donde se esquematiza la conformación de las fibras musculares y cortes histológicos con tinción H y E donde se observan fibras musculares reales.

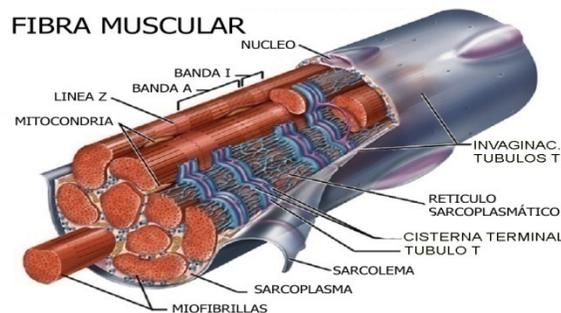


Figura 1. Organización del músculo esquelético.

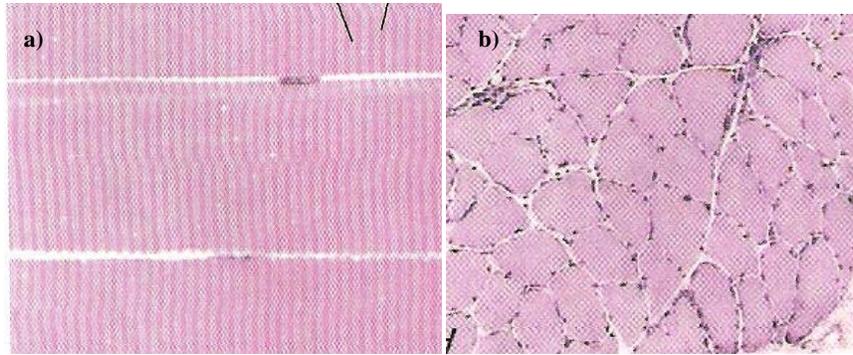


Figura 2.- a) Fotografía de las bandas claras y oscuras de un músculo esquelético. B) Tinción H y E se observan las fibras transversales y núcleos.

Las células precursoras de miocitos o células satélites, se sitúan entre el sarcolema y la membrana basal de la fibra muscular y se consideran como mioblastos persistentes. Estas son células postnatales con un alto potencial biogénico y son consideradas como reguladoras del proceso de regeneración muscular (Giddings, 1985; Bourke, 1995; Kaariainen y cols.2000).

## II. A. Características de la población miofibrilar

El músculo esquelético se ha estudiado en base al concepto ‘tipos de fibras musculares’ (Talmadge y cols. 1993; Gauthier y Padykula, 1966). Según este principio, las células musculares esqueléticas se clasifican en grupos concretos, que difieren en sus propiedades contráctiles (velocidad máxima de contracción), metabólicas (capacidad oxidativa, capacidad glucolítica, contenido de substratos) y morfológicas (tamaño, capilarización, número de mionúcleos y capilares) (Talmadge 1993; Booth y Baldwin 1996; Rivero 1997; Quiroz Rothe ,2003). La clasificación fibrilar en grupos concretos requiere que todas estas propiedades se expresen en cada célula de forma coordinada (Bergström, 1971, Botinelli y Reggiani, 2000). Esta expresión coordinada representa la base de la heterogeneidad muscular en todas las especies (Quiroz Rothe, 2001; Reggiani y Mascarello, 2004).

El fenotipo muscular o el porcentaje y las características de los tipos fibrilares varía entre individuos y está controlado por factores miogénicos (p.e: linaje genético, raza, sexo, edad) y extramiogénicos (p.e: actividad neuromuscular, dependencia neural, hormonas, sustancias extracelulares) (Quiroz Rothe 2003). La plasticidad muscular se basa en la respuesta adaptativa del músculo esquelético. Así numerosos atributos de las fibras musculares se

expresan en equilibrio dinámico, ajustándose constantemente a estímulos de diferente naturaleza (p.e: fisiológicos, patológicos) (Pette, 1990; Reggiani y Mascarello 2004).

El método inmunohistoquímico de clasificación fibrilar más extendido se basa en el polimorfismo de la miosina (Talmadge y cols. 1993; Schiaffino y Reggiani, 1996), deducido por su comportamiento diferencial frente a la reacción histoquímica convencional de ATPasa miofibrilar (Brooke y Kaiser 1970; Gauthier y Padykula, 1965). Sin embargo los análisis histoquímicos permiten determinar a nivel celular, la actividad metabólica (enzimática o concentración de diferentes sustratos) del músculo. El análisis digitalizado de estas imágenes, ha proporcionado un enorme volumen de información sobre las características de los tipos de fibras musculares (López Rivero, 1988).

La clasificación del fenotipo muscular y sus adaptaciones ha sido compleja y laboriosa. Ranvier, describe por vez primera la velocidad de contracción de distintos haces de fibras musculares (citado por López Rivero 1988). La relación entre metabolismo y velocidad de contracción fue reportada por Paukul (1904). Seligman y Rutenburg (1951), demuestran la actividad succínico deshidrogenada tisular (citado por López Rivero 1988). Padykula y Herman (1955) proponen la técnica de ATPasa miofibrilar. Engel (1962), clasifica las fibras en tipo I o de baja actividad miosín ATPásica y de tipo II o alta actividad miosín ATPásica (citado por López Rivero, 1988). Guth y Samaha (1969) demostraron que la miosina del músculo lento es más alcalino lábil y ácido estable que la del músculo rápido y concluyen que es necesario pre incubar para lograr la tinción en medios alcalinos y ácidos pre-estableciendo pH entre 9,4-9,5 y 4,2-4,5 respectivamente (citado por López Rivero 1988). Brooke y Kaiser (1970) mediante pre incubación ácida y basados en la reacción de miosín ATPasa clasifican las fibras musculares de ratas y del ser humano en tipos I, IIA, IIB, y IIC.

La actividad oxidativa y glucolítica y su correlación con la actividad ATPásica fue citada por Edgerton y cols. (1971). Edgerton y Simpson (1971), Peter y cols. (1972) propusieron las bases para una nueva clasificación fibrilar, denominando a los tipos fibras propuestos por Stein y Padykula (1962) como fibras SO (contracción lenta y metabolismo oxidativo), FOG (de contracción rápida y metabolismo oxidativo- glucolítico) y las FG de contracción rápida y metabolismo glucolítico. Burke y cols (1977) considerando la capacidad de contracción, oxidativa y glucolítica deducen la capacidad de fatiga y denominan como

fibras SR las de contracción lenta y muy resistentes a la fatiga, FR de contracción rápida y fatigo resistentes y FF de contracción rápida y fatigables ( citado por López Rivero,1988).

Dubowitz y Brooke (1973) presentan una clasificación basada en la actividad ATPásica aún vigente. La clasificación de fibras musculares basada en la actividad miosín ATPásica y su combinación de pre incubación e incubación en medios ácidos y alcalinos concluye que cada músculo y cada especie tienen una combinación óptima de rangos de pH para la demostración de su actividad miosina ATPásica estas observaciones se confirman en otros trabajos como los de Khan (1979), Mabuchi y Sréter (1982), Tunell y Hart (1977).

Mc Conathy y cols. (1983) Compararon la relación entre estructura y función y establecen una equivalencia entre las diversas nomenclaturas para describir las fibras musculares, basados en la actividad oxidativa (NADH-TR o SDH) y en el comportamiento de la miosín ATPasa frente a preincubaciones ácidas (pH 4,0-4,4) y alcalinas (pH 10,2-10,4) clasifican a las fibras en tipo I (fibras SR o SO); fibras tipo IIA (FR o FOG) y fibras tipo IIB (FF o FG).

La población fibrilar varía sus porcentajes con respecto a la topografía muscular (población superficial o profunda). Las fibras de contracción lenta son más numerosas en las regiones profundas mediales y craneales mientras que las tipo II predominan en superficie y en la periferia de los fascículos (López Rivero, 1988). Esta característica induce al concepto de compartimentalización citada por English y Letbetter (1982) y McConathy y cols. (1983) quienes definen la existencia de compartimentos formados por agregaciones de unidades motoras ordenadas, por lo que, las fibras de mayor capacidad oxidativa (ST) predominan en los compartimentos tónicos o más profundos y mediales mientras que las fibras glucolíticas (FT) se encuentran presentes en mayor número en los compartimentos más periféricos (López Rivero, 1988). En la figura 3 se observan dos cortes transversales de musculo esquelético a) Tincion ATPása donde las células mas oscuras corresponden a fibras Tipo I, las mas claras a las IIA y las intermedias a las tipo IIB. b) Tincion SDH las mas oscuras corresponden a las Tipo I, con mayor actividad succínica.

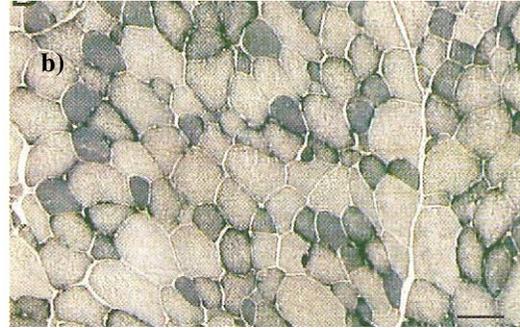


Figura 3. a) ATP asa (4,4). b) Succinil deshidrogenasa. *Aparato músculo esquelético. J.LLópez Rivero y Boffi. F. Fisiología del ejercicio en equinos. Boffi F.M.Intermedica.2007*

## II. B. MORFOMETRÍA FIBRILAR

El análisis histoquímico de los tipos de fibras muestra que éstas tienen un tamaño específico. Las fibras oxidativas o tipo I son de menor tamaño que las fibras glucolíticas o tipo II (Shubber 1972). Song y cols (1963) describieron la forma poligonal de las fibras musculares observadas en cortes transversales. Estos autores analizan los diámetros del eje mayor y del menor, estableciendo el concepto de morfometría de las fibras musculares. La valoración de los parámetros morfométricos se ha depurado y logrado resultados cada vez más objetivos basados en de los sistemas de análisis de imágenes computarizados descritos por Venema y Overweg (1974). A fin de aumentar la fiabilidad de estas mediciones, se han aplicado diferentes técnicas matemáticas (Moore y cols. 1971) entre otras y de manera especial las de ponderación estadística que corroboran la aplicación morfométrica mencionada (Staun 1972). Cornelisse y cols. (1980) al encontrar dificultades en la interpretación del valor absoluto del área de las fibras normales respecto a las patológicas, proponen dar mayor significación a los valores correspondientes a los diámetros mínimos fibrilares. Mignot y cols (1981) y Aherne y Dunnill (1982) (citado por López Rivero, 1988) introducen como parámetro óptimo para la evaluación del tamaño de la fibra muscular el área de sección transversal, proponiendo como técnicas para determinarla la planimetría o cálculos basados en el equivalente área/diámetro, el área aritmética de los diámetros mayor y menor y la media geométrica de los diámetros mayor y menor. Por otro lado y de gran importancia es determinar en el estudio del músculo el número mínimo de fibras que se deben identificar y cuantificar para obtener datos con significancia estadística,

y poder establecer un patrón morfométrico normal de la población fibrilar representativa. Entre las referencias más importantes a la morfometría y análisis digitalizado de imágenes están las de Sandstedt (1981) quien considera suficiente medir 25 fibras escogidas al azar o 50 fibras adyacentes. Maxwell y cols. (1973) y Ataron y cols. (1984) enuncian sus resultados con la medición de 25 a 100 fibras y Braund y cols. (1982) lo hacen entre 100 y 200 (citado por López Rivero, 1988).

## **II. C. PERFIL METABÓLICO FIBRILAR**

El perfil metabólico de las fibras musculares se determina mediante técnicas histoquímicas enzimáticas que evalúan las principales rutas metabólicas desde el punto de vista enzimático (Hintz y col. 1984, van der Hoven y cols. 1985), mediante procedimientos bioquímicos que determinan los sustratos energéticos (carbohidratos o lípidos) contenidos en cada fibra (Lindholm, 1975, Snow y cols. 1981, Stull, 1986) o por métodos ultraestructurales que analizan la densidad del volumen mitocondrial (Hoppeler y cols. 1983, Andreus y Spurgeon, 1986). Las actividades enzimáticas varían, entre especies (Reichmann y Pette 1982) o entre fibras pertenecientes al mismo tipo histoquímico lo que indica un amplio espectro en su perfil metabólico (Spamer y Pette, 1980, Pette 1985, Pette y Spamer 1986). Se ha reportado, el hecho de que las propiedades metabólicas y contráctiles, de cada fibra se regulan de manera independiente (Pette 1985; Pette y Spamer 1986).

Las fibras tipo I (contracción lenta) están dotadas para rendir una alta tasa de energía desde rutas aeróbicas (López Rivero 1988; Stull, 1986). Estas fibras Tienen una alta capacidad oxidativa y baja capacidad glucolítica, una alta densidad mitocondrial (Bylund y cols. 1977; Mathieu y cols. 1981) y son ricas en enzimas oxidativas, así como en abastecimiento capilar y un alto contenido de mioglobina (fibras rojas). Estas características facilitan la difusión de oxígeno por lo que las fibras presentan una mayor resistencia a la fatiga (Barlow y cols. 1984; van den Hoven y cols. 1985, López Rivero 1988). La glucosa, ácidos grasos libres, glucógeno y triglicéridos son utilizados como sustratos combustibles los que se metabolizan en este caso por rutas oxidativas (Gollnick 1982; Newsholme y Leech 1983, López Rivero 1988). La escasa cantidad de mATPása en estas mismas fibras, provoca una menor capacidad para hidrolizar el ATP, de ahí la lentitud en el rendimiento energético de

este tipo celular (Rose 1986; McMiken 1983). Las fibras tipo II producen una alta cantidad de energía desde rutas anaeróbicas, y tienen mayor potencial de consumo y de rendimiento, pero menor resistencia (Barlow, 1984; McMiken, 1983).

El cuadro 1 Resume las características principales de los diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas (López Rivero, 1988).

Cuadro 1.- Resumen de López Rivero, (1988) con las principales características del musculo esquelético

<b>Características</b>	<b>Tipos de fibras</b>			
<b>A) HISTOLÓGICAS</b>	<b>I</b>	<b>IIA</b>	<b>IIB</b>	
<b>Tamaño</b>	Pequeño	Intermedio	Grande	Barlow <i>et al.</i> 1984
<b>Color</b>	Rojo	Intermedio	Blanco	Schuber 1971 /72
<b>Densidad capilar</b>	Alta	Intermedio	Bajo	Snow 1983a
<b>Mitocondrias</b>	Numerosas	Numerosas y periféricas	Escasas	Hoppeler <i>et al.</i> 1983
<b>Densidad volumen mitocondrial</b>	5.6 %	6.7 %	0.7 % - 3.25 %	Hoppeler <i>et al.</i> 1983
<b>B) FISIOLÓGICAS</b>				
<b>Velocidad de contracción</b>	Lenta	Rápida		Howald 1982
<b>Tiempo de contracción</b>	99 – 140 ms	40 – 88 ms		Garnett <i>et al</i> 1979
<b>Veloc. de relajación</b>	Lenta	Rápida		Wiles <i>et al</i> 1979
<b>Máxima tensión</b>	12 g	25 g		Garnett <i>et al</i> 1979
<b>Veloc. Conducción de membrana.</b>	2.5 m/s	5.4 m/s		Howald 1982
<b>Elasticidad</b>	Alta	Baja		Barlow <i>et al</i> 1984
<b>Fuerza/intensidad</b>	Lento des. Baja int.	Rápido desarrollo		Barlow <i>et al</i> 1984
<b>Función</b>	Aplomos y resistencia	Propulsión y velocidad		Aberle <i>et al</i> 1976
<b>C) METABÓLICAS</b>				
<b>Cap. Oxidativa</b>	Alta	Intermedia	Baja	Snow 1983
<b>Cap. Glucolítica</b>	Baja	Intermedia	Alta	Valberg <i>et al</i> 1985
<b>Cont. Glucógeno</b>	Intermedio	Alta	Alta	Andreus/Spurgeon 19985
<b>Cont. M- ATPasa</b>	Baja	Alta	Alta	Rose 1985
<b>Ac. Glucógeno sintet</b>	Baja	Alta	Alta	Snow <i>et al</i> 1982b
<b>Act. LDH</b>	Baja	Alta	Alta	Valberg/Essén-G 1985
<b>Act. GPDH</b>	Baja	Baja	Alta	V.D.Hoven <i>et al</i> 1985
<b>Act. CS</b>	Alta	Alta	Baja	Valberg/Essén-G 1985
<b>D) HISTOQUÍMICAS</b>				

<b>Act. NADH – TR</b>	(Alta)	Intermedia	(Baja)	Essén <i>et al.</i> 1980
<b>Act. SDH</b>	(Alta)	Intermedia	(Baja)	Snow/Guy 1980

## II. D. CARACTERÍSTICAS DE LAS FIBRAS MUSCULARES DEL POLLO

Las fibras musculares y el proceso de transmisión nervioso somático y el músculo esquelético en las aves es en su esencia similar al de los mamíferos (revisar descripciones p.e: Bowman y Marshall, 1972, van den Berge 1975; Harvey y Marshall, 2000). Las diferencias funcionales requieren de adaptaciones estructurales y bioquímicas de las fibras en casos especializados como son los de las alas (fibras tipo III) (Burke y Henry. 1997; Chiang y cols. 1995). El color de los músculos (rojo o blanco) no describe adecuadamente la variedad de fibras que existen, de manera, que la mayoría de los músculos contienen una mezcla de tipos fibrilares (Khan, 1976; Toutant y cols. 1980; Billeter y cols, 1992). En las aves se han reconocido 5 tipos de fibras en base a estudios bioquímicos y morfológicos (Barnard y cols. 1982; Berri y cols. 2001). Estas fibras se denominan tipo I, lentas o rojas, tipo IIA y IIB blancas de contracción rápida y la tipo IIIA y IIIB que son intermedia, lentas y tónicas (Mckee). Una importante característica en el tejido muscular de los pollos es la presencia de fibras lentas multi-inervadas comunes en aves, reptiles y anfibios pero no en mamíferos. El cuadro 2 muestra las principales diferencias morfológicas y enzimáticas entre fibras musculares aviares. Generalmente las fibras blancas tienen una apariencia miofibrilar muy parecida a la de los mamíferos mientras que las fibras rojas muestran un aspecto miofibrilar granular y de apariencia indefinida. Las fibras de aspecto miofibrilar tienen una forma poligonal (cortes transversales), diámetro y arquitectura regular (Mckee; Baynes y Dominiczak, 1999; Dubowitz, 1985).

Cuadro 2. Datos comparativos de los diferentes tipos de fibras musculares en el pollo. (McKee, 1981)

	<b>Tipo de fibras</b>				
	<b>I</b>	<b>IIA</b>	<b>IIB</b>	<b>IIIA</b>	<b>IIIB</b>
<b>Histoquímicas</b>					
<b>ATPása (pH 9.4)</b>	Sin tinción	Fuerte	Fuerte	Medio	Fuerte
<b>ATPása (pH 4.6)</b>	Fuerte	No o débil	débil	débil	Medio
<b>ATPása (pH 4.3)</b>	Fuerte	Sin tinción	Sin tinción	débil	Medio
<b>NADH-TR<sup>a</sup></b>	Medio	Débil a medio	Sin tinción	Medio	Medio a fuerte
<b>Fosforilasa</b>	Ninguna a débil	Fuerte	Fuerte	Fuerte	débil
<b>Inervación</b>	Múltiple	Focal	Focal	Múltiple	Múltiple
<b>Histológicas</b>					
<b>Forma de la fibra</b>	Poligonal	Poligonal	Poligonal	Redondeada	Redondeada
<b>Forma del fascículo</b>	Poligonal	Poligonal	Poligonal	Redondeada	Redondeada
<b>Densidad mitocondrial</b>	Muy alto	Alto	Bajo	Muy alta	Muy alta
<b>Gotas de lípidos en la fibra</b>	No	Si	No	No	No
<b>Tamaño relativo de la fibra</b>	Pequeña / medio	Medio	Medio	Grandes	Medio
<b>Distribución de mionúcleos</b>	Periféricos	Normalmente periféricos.	Normalmente central.	Periféricos	Periféricos
<b>Composición de la fibra (%)</b>					
<b>Pectoral</b>	0	< 1	> 99	0	0
<b>PLD</b>	< 3	5-20	80-95	0	0
<b>ALD</b>	0	0	0	65-80	20-35
<b><i>Sartorius</i> (rojas)</b>	30-45	35-50	15-25	0	0
<b><i>Sartorius</i> (blancas)</b>	0	10-20	80-90	0	0
<b><i>Plantaris</i></b>	0	0	0	65-75	25-35

<sup>a</sup> NADH tetrazolium reductasa

En las fibras de aspecto granular las miofibrillas tienen un tamaño y distribución muy irregular. Estas conectan unas con otras en diferentes puntos de su longitud. Estas miofibrillas tienen aspecto de listón y sus dimensiones van de 0,5 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los músculos estriados aviares contienen filamentos de actina y miosina ordenados en un patrón clásico de interdigitaciones. Se han descrito también proteínas de otro tipo como troponina, tropomiosina y  $\alpha$  actinina (Allen y cols. 1979; Devlin y Emerson 1979), y el proceso de contracción es prácticamente similar al que sucede en los mamíferos.

El tiempo de contracción en las fibras granulares es de 5 a 10 veces menor que el de los músculos de aspecto fibrilar (Gordon y cols. 1977; Mckee). Los músculos en las aves están formados por una mezcla heterogénea de fibras rojas y blancas. Estas diferencias inherentes se relacionan con la fisiología muscular y la necesidad de mantener la posición corporal y lograr el movimiento (Fletcher, 1999, Fletcher, 2002). La proporción de los diferentes tipos de fibra varía según el músculo que se analice (locomotor o de sostén) y la profundidad de muestreo. La descripción en fibras rojas y blancas es entonces muy subjetiva y no determina por sí sola las características metabólicas de las fibras (Berri y cols. 2004; Barbut. 1997).

Peter y cols. (1972) clasificaron a las fibras musculares en tipo I, IIA y IIB basándose en la velocidad de contracción, la capacidad oxidativa y el metabolismo glucolítico. Las fibras tipo I se caracterizan por una contracción lenta, mayor capacidad oxidativa y color rojo (Lawrie, 1991). Estas fibras requieren niveles constantes de sangre y por ende nutrientes para mantener de manera duradera su función como caminar o mantenerse de pie (Hnik y cols. 1985).

Las fibras II tienen una velocidad de contracción rápida predominantemente glucolítica y son de color blanco (Bancroft y Stevens, 1982). Sin embargo las observaciones de Peter y cols. (1972) identifican fibras subtipo IIA con capacidad oxidativa- glucolítica y las subtipo IIB son primariamente glucolíticas. Las fibras tipo II con menor metabolismo oxidativo. En comparación a las fibras I presentan menor cantidad de mioglobina, menor proporción de mitocondrias, y proporción de capilares sanguíneos, pero un contenido mayor de glucógeno (Barbut1997; Henckel y cols. 1998) Los niveles de actividad de las enzimas metabólicas y de ATPasa diferencian los diferentes tipos de fibras. Las diferentes

tasas metabólicas fibrilares condicionan además las características postmortem de la carne (Mahon, 1999). Las fibras Tipo IIA de contracciones rápidas y color blanco, para músculos con movimientos repetitivos y rápidos y que no se agoten tan rápido como las fibras tipo IIB Tipo IIB de contracción rápida pero de fácil fatiga en comparación con las de tipo IIA. Estas fibras requieren altos niveles de ATP y glucógeno y se encuentran principalmente en músculos pectorales, latissimus posterior dorsalis y en un cierto grado en el músculo Sartorius y presentan una tonalidad blanca. (McKee y cols. 1997; Mammoli y cols. 2004)).

Las tipo IIIA Y IIIB, no se han identificado en mamíferos pero si en los músculos plantaris y latissimus dorsalis de las aves, estos músculos permanecen contraídos la mayor parte del tiempo porque su función es la de mantener las alas plegadas al cuerpo (Goldspink y Yang, 1999). El área transversal de las fibras musculares aumenta de manera proporcional a la edad de las aves (Dransfield y Sosnicki, 1999). Las fibras musculares de rápido crecimiento tienen un diámetro mayor que las de lento crecimiento y este hecho se ha asociado a las fibras gigantes. Estos tipos de fibras se han asociado con un incremento en glucógeno y lactato en cerdos susceptibles a estrés (McKee, 1981, McKee y cols. 1997). Este hecho se ha asociado a carne de pobre calidad PSE relacionada a un mayor cantidad de fibras tipo II blancas más susceptibles a estrés. Los músculos de los pollos tienen una predominancia natural a las fibras tipo II las que se asocian mayoritariamente a la susceptibilidad al stress y pobre calidad cárnica en otras especies productoras (Dransfield y Sosnicki, 1999; Goldspink y Yang, 1999).

Las tinciones histoquímicas utilizadas para evaluar las características morfológicas y metabólicas del músculo en las aves, se basan en las aplicadas en los mamíferos. Las reacciones de SDH y mATPása con o sin pre incubación en sal potásica de EDTA se han utilizado para establecer las poblaciones de fibras tipo I, II y III y relacionar su capacidad de contracción y capacidad oxidativa. Mediante estas técnicas se distinguen las fibras tipo I, II A (oxidativas) y II B (glucolíticas) (Goldspink y Yang, 1999)

Basados en una técnica de pre incubación y solución de sal potásica de EDTA las fibras Tipo IIA se subdividen en 2 subtipos y las IIB en 3 subtipos. Este hecho amplía la amalgama fibrilar y enfatiza la posible correlación entre datos histoquímicos, diversidad en la capacidad de contracción y las diferentes unidades motoras (Khan, 1976).

## **II.E. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS FIBRILARES Y CALIDAD DE CARNE EN EL POLLO DE ENGORDA**

Los músculos esqueléticos de los pollos difieren en cuanto a los tipos de fibras musculares, clasificadas éstas de acuerdo a sus características bioquímicas y funcionales. Estas características trascienden y determinan la calidad de la carne. El pollo y el pavo se han seleccionado para lograr un rápido crecimiento de los músculos pectorales correlacionado este hecho con su peso corporal, el peso muscular y tamaño fibrilar (Mahon y cols. 1999). Las fibras musculares cambian de tamaño de acuerdo a la edad en los pollos a la profundidad de muestreo y así las fibras rojas tipo I de la pierna son más pequeñas en diámetro comparados con aquellas de tipo IIA y IIB del músculo pectoral (Mahon y cols. 1999). Sin embargo se ha mostrado que mientras el aumento del tamaño de los músculos tales como el abductor lateral y el gastrocnemio son proporcionales al peso corporal, el pectoral superficial es proporcionalmente mayor y tiene un mayor rapidez en el tamaño fibrilar (Wilson, y cols. 1990).

Los pollos y pavos tienen proporcionalmente más fibras de tipo II de contracción rápida que tiene una mayor susceptibilidad al estrés y desarrollo del rigor mortis (de 4 a 6 hrs en el pollo). Se sabe que hay una alta susceptibilidad en el pollo y pavo a una rápida glucólisis que promueve una carne pálida, suave y exudativa (PSE). En estas aves se han observado importantes disminuciones en los valores de pH a los 20 minutos post-mortem. Esta condición es similar al síndrome PSE en el cerdo. Debido a que los músculos alcanzan valores muy bajos de pH y las canales aumentan sus temperaturas, se produce una rápida desnaturalización de las proteínas de este producto alimenticio (Offer, 1991; McKee y Sams 1998).

Además de los cambios bioquímicos que se producen en los músculos que sufren PSE se han asociado otros factores como miopatías focales que influyen en la consistencia y ternura de la carne (Sosnicki and Wilson, 1991, Shear, 1971). La degeneración muscular se caracteriza por necrosis focal, proliferación de tejido graso y conectivo así como hipercontracción fibrilar. La hipercontracción muscular se ha asociado con el proceso de endurecimiento del pectoral superficial, y el proceso degenerativo de las fibras tipo IIA y

rojas de los músculos de la pierna (Grey y cols. 1986; Mahon y cols. 1999). Es decir aquellos músculos con una menor degeneración de fibras musculares tipo II tienden a ser más suaves que las fibras rojas o tipo I. Una razón de esta diferencia es el proceso de endurecimiento entre fibras tipo I y II; que parece estar asociada con la diferencia en susceptibilidad al acortamiento en frío. Este fenómeno se ha asociado a una ineficiente recaptura de calcio en las fibras rojas. El calcio promueve la contracción muscular. Se sabe que este ión se encuentra almacenado en el retículo sarco endoplasmico el que no está tan desarrollado en las fibras rojas en comparación con las fibras tipo II o blancas (Sturkie, 1986). Smulders y cols (1990) proponen que entre más alto sea el grado de fibras oxidativas más alto será la propensión a la ternura de la carne. Más aún existen relaciones directas entre las fibras tipo IIB y la ternura de la carne (Totland y cols. 1988, Mahon, 1999). Otros factores como el diámetro fibrilar, el número de fibras por sección y la presencia de tejido conectivo y grasa influyen también en la ternura de la carne. Berri y cols. 2001 al estudiar la calidad de la carne reportan que el pH, color del músculo asociado a las características de composición y metabólicas del músculo en 4 líneas comerciales de pollo de engorda y líneas sin selección se observa que en las primeras exhiben un mayor peso corporal y masa pectoral (61 % aproximadamente) con respecto a las segundas (21 %). La selección comercial tiene como resultado un mayor contenido de proteínas y menor humedad en el músculo pectoral. Sin embargo estos autores concluyen que no se puede intuir que la selección sea un factor único en la calidad cárnica ya que muestran también postmortem mínimos descenso del pH y alteraciones en el potencial glucolítico (Berri y cols. 2001, Sauver, 1997, Shear, 1971).

A diferencia de la carne de otros animales la grasa en los pollos se deposita inicialmente a de manera subcutánea. La carne de pollo contiene mínimas infiltraciones intramusculares de grasa (Essen Gustavson y cols. 1985). La carne blanca del pollo tiene generalmente menos del 1.3 % de grasa esto es atribuible a los triglicéridos encontrados en la membrana del músculo. La carne roja del pollo tiene cerca del 7.3% de grasa (Mountney, 1989; Goldspink y cols. 1999). La carne de pollo roja tiene mayor tipo de fibras oxidativas que contienen más mioglobina y mitocondrias (Dransfield y cols. 1999).

## **II.F. MANEJO DE LAS BIOPSIAS MUSCULARES**

La obtención de las muestras musculares se realiza de manera quirúrgica, utilizando bisturí para realizar los cortes inmediatamente después sacrificar al animal. Una vez obtenidas las muestras se debe proceder a su conservación. Para este fin se pueden utilizar varias opciones, ya sea la fijación con formaldehído bufferado o glutaraldehído, la congelación directa en nitrógeno líquido o la congelación indirecta en isopentano sumergido en nitrógeno líquido. Esta última es considerada la de mayor utilidad, ya que se lesiona mínimamente el tejido para realizar posteriormente análisis, histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos (Quiroz Rothe 2003). Sea cual sea la técnica de conservación el músculo deben colocarse por unos minutos en una gasa con solución salina fisiológica un par de minutos para permitir su relajamiento y se recubren sobre una base de corcho o el embolo de una jeringa pequeña con una solución de *Tissue-Tek OCT compound* a fin de proteger la integridad celular. Se procede entonces a congelar de manera ultrarrápida la muestra de acuerdo a la técnica de Dubowitz y Brooke, 1973 modificado.

Se coloca dentro en un vaso de precipitado (100ml) una cantidad suficiente de 2 metilbutano (isopentano). Este vaso se introduce en un termo resistente o en el vaso de Dewar el cuál contiene nitrógeno líquido (-196°C). Es importante no permitir que el nitrógeno contamine el isopentano. Este hidrocarburo debe dejarse enfriar durante unos minutos identificando, el escarchamiento o congelación del fondo y paredes del vaso, este es el momento de introducir la muestra muscular en el isopentano para lograr su congelación indirecta. Con esto se evita la formación intrafibrilar de artefactos por congelación. La muestra se deja sumergida en el isopentano enfriado a -70 C durante un par de minutos, se coloca en un tubo de Eppendorf, se identifica y deja en nitrógeno o en un congelador de -70°C en el laboratorio.

Las muestras se cortan en el laboratorio utilizando un criostato o histocriotomo, obteniendo cortes seriados de 8 a 14 micras para su posterior tinción. La única condición es que las fibras estén orientadas en una posición transversal, e identificar que la congelación se haya realizado de manera correcta mediante observación directa en fresco o auxiliado de tinciones histológicas (hematoxilina–eosina)

Las tinciones histológicas e histoquímicas (enzimáticos o no enzimáticos) comúnmente utilizadas son hematoxilina – eosina (HE) (Dubowitz y Brooke 1973), miosin ATPasa con preincubaciones acidas y alcalinas a distintos pH (Brooke y Kaiser 1973), succinil deshidrogenada (SDH) (Bancroft y Stevens), glicero fosfato deshidrogenada, ácido periódico de Schiff (PAS),  $\alpha$  PAS amilasa. Los protocolos de éstas técnicas se encuentran descritos en la bibliografía especializada. La HE permite determinar las características morfológicas y contabilizar los núcleos. Dependiendo de la especie y del músculo a analizar existen un rango de labilidad de pHs para la demostración de la actividad mATPása (Müntener, 1979) y debido a que la temperatura del medio de pre incubación puede cambiar completamente el patrón histoquímico de tinción del músculo (Guth y Samaha 1970, Erzen, 1986) se menciona que es conveniente realizar variaciones de una décima de este pH tanto en la pre incubación ácida como en la alcalina. La combinación óptima de valores de pH del medio de preincubación, es definida como aquella que proporciona el mejor contraste para la diferenciación de los tres tipos principales de fibras (López Rivero, 1988), identificando por mATPása alcalina fibras alcalino lábiles (tipo I) y alcalino estables (tipo II) (López Rivero, 1988). Con la técnica de mATPása ácida se identifican fibras oscuras ácido lábiles (tipo I), ácido lábiles claras (tipo IIA) y ligeramente ácido lábiles, intermedias (tipo IIB). Dada la escasa presencia de fibras tipo IIC en individuos adultos normales se desestima su consideración morfométrica (López Rivero, 1988). Esta técnica se ha correlacionado directamente con la velocidad de contracción muscular. En el caso de músculo de pollo las tinciones sometidas a una pre incubación alcalina (pH 9.4) o acida (pH 4.6 o pH 4.3). En la pre incubación alcalina los cortes primero se pre incuban en una solución 0.2 M barbital-acetato bufferado por 5 min a un pH 4.6 - 4.3, y se lavan en cloruro de barbital-cálcico por algunos segundos. Posteriormente se incuba a (pH 9.4) por 40 min (12).

Mediante la tinción de SDH o NADH tetrazolium reductasa (NADH-TR) (Dubowitz y Brooke 1973), se pueden diferenciar fibras de reacción oxidativa, ST (intensa), FTH (moderada) y FT (ligera) (López Rivero, 1988). Sin embargo, debido a la dificultad para diferenciar objetivamente entre fibras de alta e intermedia intensidad de tinción (Snow y Guy, 1980) se consideran solo las fibras de alta y baja intensidad. Se considera entonces que en base a la reacción de NADH-TR y su relación con la actividad mATPása, las fibras

FT son de rápida contracción y baja capacidad oxidativa, las ST son de contracción lenta y alta capacidad oxidativa y las FTH son de rápida contracción rápida y alta capacidad oxidativa (López Rivero,1988)

La capacidad glucolítica de las fibras se indica con una tinción oscura indicada por la precipitación catalizada por la enzima alfa-glicerofosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ GPDH). Las modificaciones a esta técnica de Sigel and Pette (15), permite diferenciar diferentes tonalidades de intensidad reactiva.

### **III. BASES DEL ANALISIS DE IMÁGENES**

La evaluación de muestras histológicas se ha basado en el análisis visual. La correcta interpretación de las imágenes depende de la experiencia del analizador y la capacidad del mismo para tomar decisiones basándose en el análisis visual y en sus conocimientos teóricos. La interpretación objetiva de las imágenes provee datos que sostienen el diagnóstico, pronóstico y tratamiento asertivo. A fin de minimizar la discordancia diagnóstica se hace uso del análisis de imágenes, que permite realizar una evaluación cuantitativa y medición objetiva de las imágenes microscópicas (Gundersen y cols. 1988; Romano y cols.1996; Userpater y cols 2003). El análisis de imagen incluye los procedimientos involucrados en la obtención, conservación, manipulación, optimización y estudio de una imagen (p.e: histológica) fin de obtener información objetiva de la misma (Gundersen y cols. 1988; Weibel, 1989; Userpater y cols 2003).

La medición de las formas de los organismos (morfometría) permite comprender procesos fisiológicos, patológicos o realizar el seguimiento de tratamientos, a través de los cambios citológicos observados en diferentes tejidos. Gracias a la histometría es posible medir parámetros tridimensionales (estereología) (Userpater y cols 2003). Los métodos estereológicos semicuantitativos han sido usados para sustituir la evaluación visual subjetiva. Los métodos morfométricos permiten calcular el volumen ocupado por una estructura dentro de un tejido, la densidad volumétrica del citoplasma y el número de células por volumen (Weibel, 1989; Userpater y cols 2003). Estos parámetros morfológicos se correlacionan directamente con la función tisular (Weibel, 1989; Userpater y cols 2003)

Las determinaciones histométricas a partir del microscopio óptico y los registros fotográficos obtenidos se pueden realizar mediante métodos cuantitativos semiautomáticos que agilizan el proceso de cuantificación; pero el uso de computadoras y de programas informáticos destinados al análisis de imágenes logra cuantificaciones objetivas y repetibles (Weibel, 1989; Userpater y cols 2003).

La bibliografía reporta la correlación entre inmunocomplejos y la densidad óptica de un objeto (Wells, 1993; Portiansky y cols.). Las reacciones estequiométricas establecen una relación entre las estructuras marcadas y la intensidad del color (Montes, 1996; Wells, 1993). La cuantificación de reacciones colorimétricas permite identificar determinadas estructuras, establecer su número o área de tinción y su densidad óptica. El análisis computarizado de imágenes es ideal para la cuantificación de reacciones estequiométricas (Wells y cols, 1993).

Las secciones del tejido que vaya analizarse debe de estar libres de artefactos y en el caso del tejido muscular la sección debe de incluir al menos 50 fibras que puedan ser correctamente identificadas. Las células deben numerarse aleatoriamente pero siempre deben de ser las mismas (en cada tinción analizada) y a esta sección se le llama también mapa o máscara fibrilar. Se debe de determinar un valor densidad óptica como referencia es decir, se calcula un valor blanco en cada tinción y debe ser considerado como valor mínimo en cada muestra analizada. Se debe de establecer también la medida del área o estructura a analizar y poder determinar posteriormente la densidad de diferentes organelos en un área transversal (p.e: núcleos o capilares en  $1000\mu\text{m}^2$ ) (Quiroz Rothe y L.Rivero, 2001).

#### **IV. GENERALIDADES DE LOS FARMACOS BETA BLOQUEADORES**

El estudio de los receptores adrenérgicos, inicia con Ahlquist (1948), quien basándose en la potencia de los agentes agonistas demuestra la existencia de dos clases de receptores adrenérgicos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (Emorine y cols. 1994). Desde entonces el estudio de los receptores alfa y beta adrenérgicos ha determinado un importante progreso de la farmacología. Los receptores beta (glucoproteínas integrales de la membrana celular) son primariamente activados por el isoproterenol, luego por adrenalina, y finalmente con menos sensibilidad por la noradrenalina. Los receptores  $\beta$ , se subdividen en  $\beta_1$  (cardioselectivos),  $\beta_2$  (músculo

liso) y  $\beta_3$  (localizados especialmente en los adipocitos) relacionados estos últimos con el metabolismo lípido intracelular (Young y cols. 2000; Alexander y cols. 2007). La activación de los receptores  $\beta_3$  estimula las lipasas específicas (p.e: triglicérido lipasa), para inducir lipólisis y elevar la lipemia. Así mismo la activación de estos receptores estimula las proteínas  $G_s$ , las cuales incrementan la concentración de AMPc que activa a su vez la proteína cinasa  $A_1$ , la que fosforila diversas proteínas para activar o desactivar diferentes funciones celulares (Kahn y cols. 2005; Mersmann, 1998; Young y cols. 2000; Sumano y cols. 2002). Los beta bloqueadores producen una atenuación de la hiperlipemia, tras su administración se ha observado una moderada elevación de los triglicéridos y disminución de lipoproteínas de alta densidad (Pietri-Rouxel y cols. 1995)

Los receptores  $\beta_3$  son considerados atípicos porque o no son bloqueados, o lo son muy escasamente, por los bloqueadores beta clásicos. Estos últimos actúan como antagonistas competitivos de los estimulantes beta, en consecuencia disminuyen o inhiben los efectos de la estimulación simpática directa o refleja. Es decir a la estimulación de los nervios simpáticos o a la acción de fármacos considerados estimulantes adrenérgicos beta, bloqueando el efecto cronotrópico e inotrópico positivo de las catecolaminas o de medicamentos y otras acciones estimulantes beta cardíacas (Mersmann, 1998). Tienen eficacia en el tratamiento de la **hipertensión, cardiopatía isquémica** y ciertas **arritmias**. Los efectos terapéuticos incluyen acción ansiolítica, reducción del tono simpático y de la taquicardia (efecto cronotrópico negativo), disminución de la liberación de renina, reducción del retorno venoso y del volumen plasmático, aumento del periodo diastólico, y efectos antitrombóticos (Pietri-Rouxel y cols. 1995). Los beta bloqueadores tienen una acción ansiolítica, principalmente cuando la génesis de la ansiedad se relaciona con un exceso de la actividad simpática, reduciendo temblor, las palpitaciones y la taquicardia, que se produce paralelamente (Emery y cols.1984).

La administración de estos fármacos promueve la disposición de grasa corporal (Emery y cols.1984), este efecto se ha observado en bovinos, ovinos, cerdos. El incremento gradual en la masa muscular que se logra con estos fármacos se atribuye al aumento de la síntesis de proteínas musculares, la reducción en la degradación de estas, o a una combinación de ambos (Mersmann, 1998; Molones y cols. 1994). La disminución en el recambio proteico se asocia con una reducción en la excreción de nitrógeno e incremento muscular del ARNm

para la calpastina (Killeffer y Koohmaraie, 1994). La movilización de aminoácidos hacia el interior del músculo y de ácidos grasos no esterificados, utilizados como fuente de energía promueve la deposición gradual de las proteínas y la hipertrofia muscular (Byrem y cols. 1998). Sin embargo Rehfeldt y cols. (1994), mencionan que se presenta un fenómeno en el aumento del tamaño de fibras musculares en el músculo extensor hallucis al administrar una dosis de 1mg /kg de clenbuterol en pollos de engorda. Se ha descrito que el uso de los beta bloqueadores, incrementa significativamente la ganancia diaria de peso, la conversión alimenticia, el peso de la canal siendo controvertido el efecto de estos fármacos en la suavidad de la carne (Avendaño-Reyes y cols. 2006). Los beta agonistas tienen un efecto como promotores del crecimiento en varias especies (Beerman y cols. 1987; Sainz y cols. 1993; Rehfeldt y cols. 1997). También se ha descrito que disminuyen el depósito de grasa en bovinos, ovinos, cerdo y pollos (Molones y cols. 1991).

#### IV.A. CARACTERÍSTICAS DEL CARAZOLOL

El 4-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy) carbazole (Figura 4) fue desarrollado en 1975 como un antagonista adrenergico  $\beta_1$ - $\beta_2$ , y agonista  $\beta_3$  es un fármaco antihipertensivo usado en medicina humana y veterinaria. Tiene una estructura análoga a las catecolaminas (Figura 5), (adrenalina y noradrenalina), cuando se administra inhibe los efectos adrenérgicos impidiendo la acción de estas, por saturación de los sitios de acción (Sievers, 1977; Innis y cols. 1979)

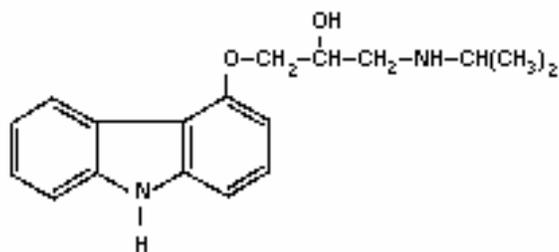


Figura 4.- Formula estructural del carazolol (Morris y cols. 1978).

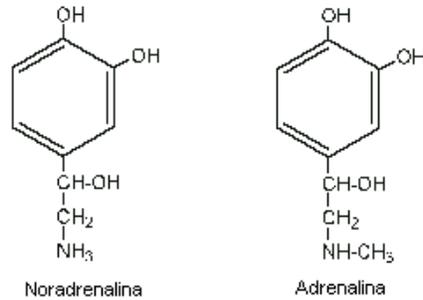


Figura 5 Formula estructural de las principales catecolaminas (Morris y cols. 1978)...

El carazolol es un fármaco bloqueador selectivo de los adrenoreceptores postsinápticos  $\beta_3$ . Tiene un efecto inhibitorio de la acción de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), de la adenilciclase y del AMPc (Morris y cols.1978). Se ha utilizado como agente tranquilizador en animales y en el ser humano. No causa ni sedación ni somnolencia y el animal mantiene su estado de alerta, ya que dicha molécula provoca una reducción del estado de agitación, sin inhibición de la reacción al estímulo fisiológico a nivel del Sistema Nervioso Central (actividad simpaticolítica) y anula el fenómeno de agresividad y canibalismo, favorece la sociabilización y disminuye el estrés (Menjean y cols.1995; Innis y cols.1979; Rudloff y cols. 1984; van Leeuwen). El estrés crónico produce una liberación excesiva de adrenalina y noradrenalina las cuales producen entre otros, un incremento en la contractibilidad del miocardio (Bartsch y cols. 1977) y un incremento en el metabolismo energético (e.i: del glucógeno hepático y muscular así como la movilización de ácidos grasos) (Menjean y cols 1995; Costil y cols. 1983; van Leeuwen). El carazolol previene la activación del metabolismo energético provocado por las catecolaminas. Además reduce la lipólisis, el gasto energético, promueve la movilización de grasas e inhibe su depósito evitando la acumulación a nivel hepático. Como hemos mencionado, esta molécula inhibe los efectos del estrés crónico, producido por estímulos de origen físico-químico o psicológico (p.e: competencia social, nutricional, embarques, movimientos dentro de los corrales, exceso de calor, etc) (Sievers, 1977; van Leeuwen). La acción de este fármaco a nivel del sistema nervioso autónomo-simpático incluye la disminución de la taquicardia, la hipertermia y reduce la pérdida de peso. Previene la acidosis metabólica, acción que a nivel muscular se ve reflejada como mejoría en la calidad de la carne. Bloquea la formación de

cuerpos cetónicos, reduce la glucólisis y previene la formación de lactato. En cerdos y bovinos se ha probado con eficacia para inhibir los efectos indeseables del estrés durante el parto, transporte, reubicación y adaptación de los animales (p.e: reduciendo la mortalidad no infecciosa relacionada con la movilización de los animales así como con el deterioro en la calidad de la canal) (Menjean y cols.1995; Kai, 1984). El carazolol está contraindicado en animales con insuficiencia cardíaca, bradicardia, broncopatía obstructiva y durante la gestación (Gregory y cols. 1982; Costin ,1983)

La dosis por vía intramuscular en bovinos y cerdos es de 1 mg /100 kg. La administración por esta misma vía permite una absorción rápida y un efecto evidente por cerca de 10-12 horas. La principal vía de eliminación es urinaria (85-90% primeras 24 hrs) y el resto por vía hepática y fecal. Administrado por vía oral logra una buena absorción en el tracto gastrointestinal (Abshagen y cols.1980, Costin, 1983). Sin embargo la biodisponibilidad oral es de aproximadamente el 10 % por lo que se requieren 10 veces más dosis por vía oral que por vía parenteral para lograr el mismo efecto. El metabolismo del carazolol es comparable en cerdos, bovinos y humanos. El tiempo de retiro en animales productores de carne es tan solo de 24 hrs. La ingesta diaria admisible (ADI) es de 1 µg/ kg (1ppb). No se han observado efectos teratogénicos o mutagénicos o efectos sobre la fertilidad (Costil y cols. 1983; Kadir y cols. 1990)

Hasta el momento no se ha encontrado bibliografía donde se describan los efectos, morfológicos, metabólicos, o contráctiles en las fibras musculares producidos por el carazolol en músculo esquelético del pollo de engorda.

## **SEGUNDA PARTE**

### **TRABAJO EXPERIMENTAL**

## **I. JUSTIFICACIÓN**

Es imperativo disminuir los factores que modifican la calidad de la carne de pollo, refiriéndose a aquellos relacionados con el síndrome del estrés aviar (manejo, transporte, sacrificio) y que provocan una carne suave, pálida y exudativa. El carazolol podría representar una posibilidad terapéutica para lograr este objetivo. Con base en una amplia consulta bibliográfica no existen datos al respecto, por lo que este trabajo permitirá establecer las bases que permitan comprender y disminuir los factores que afectan la calidad cárnica del pollo de engorda.

## **II. HIPÓTESIS**

La administración oral del carazolol, podría inducir la adaptación en las características celulares (morfológicas, metabólicas y contráctiles) del músculo esquelético del pollo de engorda, expuesto a una situación de estrés (manejo, transporte).

## **III. OBJETIVO GENERAL**

Identificar y categorizar las características morfológicas, metabólicas y contráctiles del fenotipo muscular del pollo de engorda frente a una situación de estrés (manejo).

Determinar los posibles cambios en el fenotipo muscular del pollo de engorda por efecto del carazolol administrado por vía oral, lo cual podría disminuir los efectos del estrés a nivel muscular.

### **III.A.OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar mediante técnicas histológicas e histoquímicas cuantitativas las características morfológicas (área transversal, densidad de núcleos, densidad de capilares), contráctiles (velocidad de contracción) y metabólicas (actividad oxidativa, glucolítica y contenido de glucógeno) del músculo esquelético del pollo de engorda.
2. Determinar mediante técnicas histológicas e histoquímicas cuantitativas las características morfológicas (área transversal, densidad de núcleos, densidad de capilares), contráctiles (velocidad de contracción) y metabólicas (actividad oxidativa, glucolítica y contenido de glucógeno) del músculo esquelético del pollo de engorda expuesto un tratamiento oral con carazolol.

#### **IV. MATERIALES Y METODO**

Cualquier procedimiento en cuanto al cuidado y sacrificio de los pollos utilizados en este trabajo, se llevo a cabo de acuerdo con los lineamientos del Comité Interno para el Cuidado de Animales de Experimentación (CICUAE) del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la UNAM así como a los de legislación Mexicana vigente para el uso de animales en experimentación.

##### **IV.A. ANIMALES**

Se formaron 2 grupos con pollos de engorda, estirpe Ross de 5 semanas de edad (grupo control = 5n y grupo con tratamiento = 10n). El status sanitario de los pollos se consideró adecuado. Durante la realización del trabajo los animales se mantuvieron en instalaciones en condiciones adecuadas de temperatura ambiental ventilación, aporte de agua y alimento comercial de finalización *ad libitum*. Siendo el manejo diario de alimentación e higiene (limpieza de las jaulas) el factor de estrés.

##### **IV.B. OBTENCIÓN Y MANEJO DE BIOPSIAS MUSCULARES**

Los animales fueron sacrificados con sobredosis intamuscular de ketamina, en la pechuga.

**Grupo Control (Gc):** De cada uno de los animales se obtuvieron biopsias de los músculos femoral y pectoral inmediatamente después de su sacrificio (6ª semana de edad). Las biopsias se colocaron en gasas humedecidas con solución salina al 0.9% para permitir su relajación y se congelaron en isopentano enfriado en nitrógeno líquido, conservándolas en un congelador a menos 70°C hasta su análisis medio de una batería de tinciones histológicas e histoquímicas.

**Grupo tratado (Gt).** A cada uno de los pollos se les administró una dosis única de carazolol (100 µg/kg – día 0/5ª semana de edad) directamente en el buche por medio de una sonda metálica unida a una jeringa, al inicio de la semana 5. Esta dosis se calculó en base a la dosis recomendada en bovinos y cerdos (10 µg/kg) vía intramuscular, pero dado que por vía oral tiene una biodisponibilidad del 10%, la dosis se incremento a 100 µg/kg.

Se obtuvieron biopsias de los músculos pectorales y femorales inmediatamente después del sacrificio a los 2, 4 y 8 días post tratamiento (6ª semana de edad). Las biopsias se colocaron en gasas humedecidas con solución salina al 0.9% para permitir su relajación y se congelaron, en isopentano enfriado en nitrógeno líquido, conservándolas en un congelador a menos 70°C hasta el momento de su análisis.

#### **IV. C. TECNICAS HISTOLOGICAS E HISTOQUIMICAS**

A cada una de las biopsias de ambos grupos se les realizaron cortes transversales seriados de 10 a 14  $\mu\text{m}$  en un criotomo a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Estos cortes fueron analizados mediante una batería de tinciones histológicas - Hematoxilina-eosina (densidad de mionúcleos y examinar la arquitectura fibrilar) PAS: Acido periódico de Schiff (tinción selectiva del glucógeno intrafibrilar). $\alpha$ -amilasa-PAS: (densidad de capilares y detectar polisacáridos  $\alpha$ -amilasa resistentes), ATPasa miofibrilar tras preincubaciones a diferentes pH's (marcador de la velocidad de contracción máxima de las miofibras), SDH: actividad succínico deshidrogenasa (enzima mitocondrial usado como indicador de la capacidad oxidativa), GPDH: actividad glicerol-3 fosfato deshidrogenada (marcador indirecto de la capacidad glucolítica).

Los cortes histológicos se examinaron por medio de microscopia óptica y se digitalizaron las imágenes obtenidas

#### **IV.D. DIGITALIZACION Y ANALISIS DE IMÁGENES**

Este proceso se realizó mediante un sistema de análisis de imagen semi-automático computarizado, integrado por: un microscopio óptico (*Motic<sup>®</sup> TypeBA200*), una cámara digital de alta definición, una tarjeta gráfica y un software comercial de análisis morfométrico (*Image Pro<sup>®</sup>-Plus. 4.5. Windows; media Cybernetics, Inc. MD. USA*).

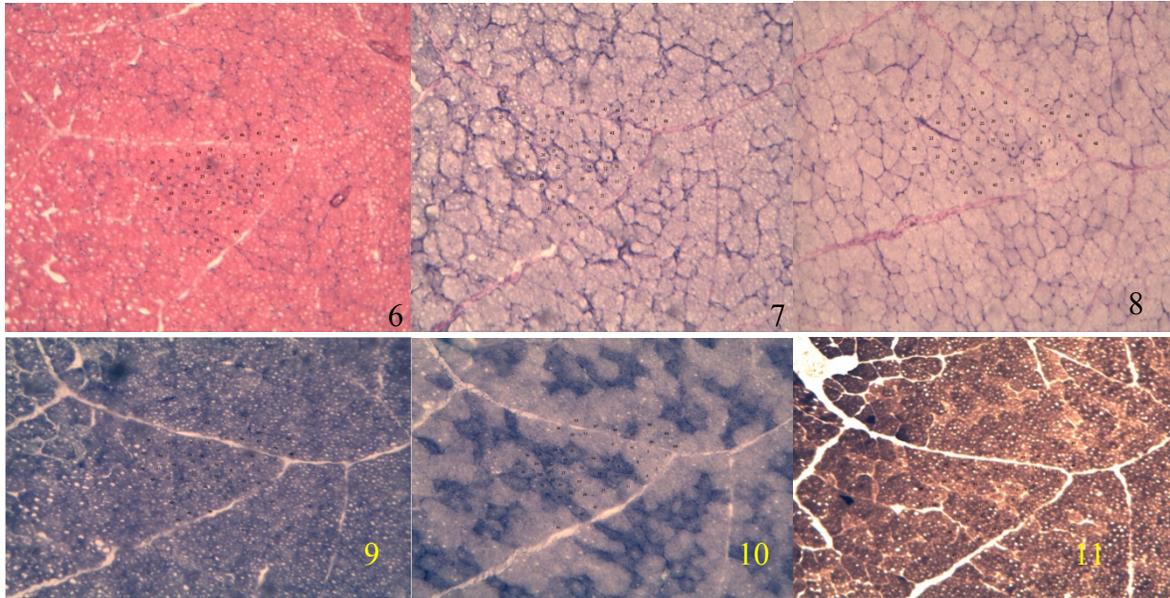
Las secciones del tejido que se analizaron estuvieron libres de artefactos incluyendo 50 fibras en el conteo. Las células se numeraron aleatoriamente y siempre fueron las mismas (en cada tinción analizada). Se determinó el valor densidad óptica de referencia (blanco) en cada tinción. Se estableció la dimensión morfo métrica del área transversal de las miofibras,

siendo en general igual o mayor a los  $1000\mu\text{m}^2$  lo cual permite determinar las diferencias morfológicas (p.e: área transversal, densidad capilar y de mionucleos).

**IV.E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.** Se creó una base de datos con las observaciones de los cortes seriados de biopsias musculares de los animales del grupo control y tratado. Se identificaron y cuantificaron en cada uno de estos cortes, 50 miofibras localizadas siempre en la misma área, libre de artefactos. Esta identificación permitió clasificar de manera objetiva célula a célula, el porcentaje de tipos fibrilares basándose en sus características morfológicas (densidad de núcleos y capilares, su área transversal), metabólicas (contenido de glucógeno intrafibrilar, su velocidad de contracción y actividad oxidativa o glucolítica). Se realizó un análisis estadístico descriptivo (medias y desviaciones estándar) de las poblaciones fibrilares en el grupo control y en el grupo tratado a los 2, 4 y 8 días post administración del carazolol. Se determinó el porcentaje de cada uno de los tipos fibrilares en el grupo control y el tratado. Para lograr este análisis se utilizó un programa computarizado estadístico SAS. Y las pruebas realizadas fueron Kruskal-Wallis y prueba de Dunnett ya que los datos obtenidos no presentaban distribución normal.

**V. RESULTADOS.** Las figuras 6 a 11 muestran fotografías microscópicas de la misma sección de cortes transversales de biopsias musculares teñidas con hematoxilina – eosina, Acido Periódico de Schiff (PAS), Succinil Deshidrogenada SDH, Glicerol fosfato deshidrogenada (GPDH),  $\alpha$ -amilasa PAS y miosín ATPasa con una pre incubación ácida.

Los resultados descriptivos del grupo control y tratado con carazolol de musculo femoral se presentan en las figuras 12 a 49 y en los cuadros correspondientes (Cuadros 3 a 8).



Figuras 6 – 11. Imágenes de microscopía óptica a 10 x, de las diferentes tinciones histológicas e histoquímicas de biopsias musculares esqueléticas del pollo de engorda tratado con carazolol. 6) hematoxilina- eosina H-E, 7) Acido peryódico de Schiff PAS; 8)  $\alpha$  amilasa-PAS 9) 3Glicerofosafato deshidrogenasa GPDH; 10) Succinil deshidrogenasa SDH; 11) miosin ATPasica/ pre incubación ácida.

## MÚSCULO FEMORAL

### Fibras tipo I

El cuadro 3 muestra los valores descriptivos de las características a) morfológicas (densidad de núcleos, de capilares y área transversal), b) metabólicas – actividad oxidativa (SDH), actividad glucolítica (GPDH) y concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) de las fibras tipo I del músculo femoral de 15 pollos estirpe Ross de 5 semanas incluidos en el grupo control (D0= 5n) y grupo tratado con carazolol (100  $\mu$ g /kg) (D2, D4, D8= n10). Las medias se obtienen a partir de la cuantificación de 50 miofibras seleccionadas aleatoriamente en una zona carente de artefactos o de daño. La identificación es siempre de las mismas células y en cada una de las tinciones (morfológicas: HE, metabólicas: SDH, GPDH y PAS). Esta relación morfológica y metabólica permite clasificar a nivel celular el tipo celular (tipo I). El promedio de fibras tipo I del músculo femoral en el grupo control (D0 /n=5) fue de 7 fibras por observación (50 fibras observadas por muestra) (Figura 12). El área transversal promedio de estas fibras es en el grupo control (D0) fue de 666.2  $\mu$ m<sup>2</sup>, mientras que el promedio de densidad nuclear fue de 6.37 núcleos y de capilares fue de 6

por fibra respectivamente (Figuras 13, 14 y 15). El promedio de actividad glucolítica GPDH en estas fibras fue de 0.558 Do (Figura 16), el de actividad oxidativa SDH 0.5 Do (Figura 17) y la concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) fue de 0.763 Do (Figura 18). El valor de referencia para la densidad óptica tiene un valor de 1 Do. (Blanco). En el grupo tratado (n=10) se observó lo siguiente: Al día 2 pos tratamiento (D2) el promedio de fibras tipo I del músculo femoral fue de 3 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra). Al día 4 pos tratamiento (D4) el promedio de fibras tipo I del músculo femoral subió a 25 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra) siendo el promedio más elevado (Figura 12) y al día 8 pos tratamiento (D8) el promedio de fibras tipo I del músculo femoral fue de 20 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra) (Figura 12). Además en el grupo tratado el promedio más alto de densidad nuclear fue de 6.57 núcleos por fibra al día 4 post tratamiento (D4). El promedio más alto de densidad capilar fue de 7.38 capilares por fibra al día 8 post tratamiento (D8). El promedio más alto de área transversal fue  $2155 \mu\text{m}^2$  y se observa al día 4 post-tratamiento (D4) (Figuras 14, 15 y 25). La menor actividad glucolítica (GPDH) 0.62 DO, se observó al día 2 post-tratamiento (D2) (Figura 16), mientras que la mayor actividad oxidativa (SDH) fue de 0.405 DO al día 4 post tratamiento (D4) (Figura 17). La concentración más alta de glucógeno intrafibrilar fue de 0.88 Do alcanzada al día 4 pos tratamiento (D4) (Figura 18).

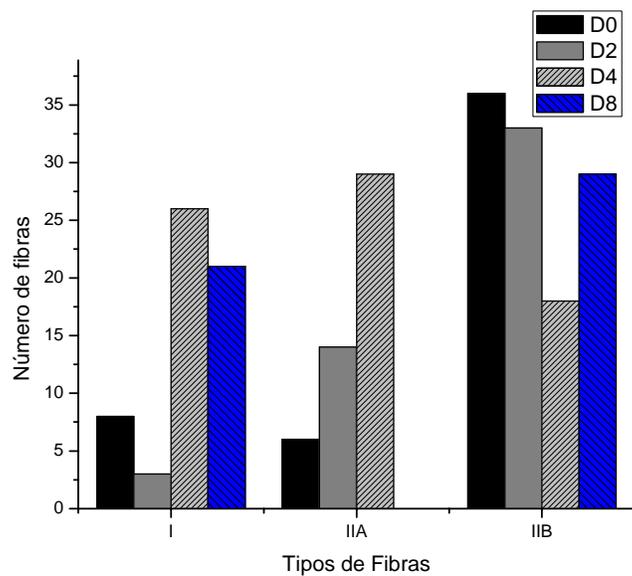
## **ESTADÍSTICA**

En las fibras tipo I, no se encuentran diferencias significativas con una ( $P < 0.05$ ), en cuanto a núcleos, ni en el conteo de GPDH, a diferencia de número de capilares con una ( $P < 0.05$ ) entre los tiempos 0, 2 y 8 días. Teniendo un número mayor de capilares al día 8 pos tratamiento, así mismo, la mayor diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre el tratamiento a los 4 días en relación al día 0. Observándose un aumento en el tamaño transversal de las fibras hacia el día 4 pos tratamiento. En cuanto a SDH se observan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre todos los días pos tratamiento observándose una menor actividad metabólica al día 4 después de la administración del carazolol. Por otra parte se observa una mayor diferencia estadística en cuanto a la cantidad de glucógeno

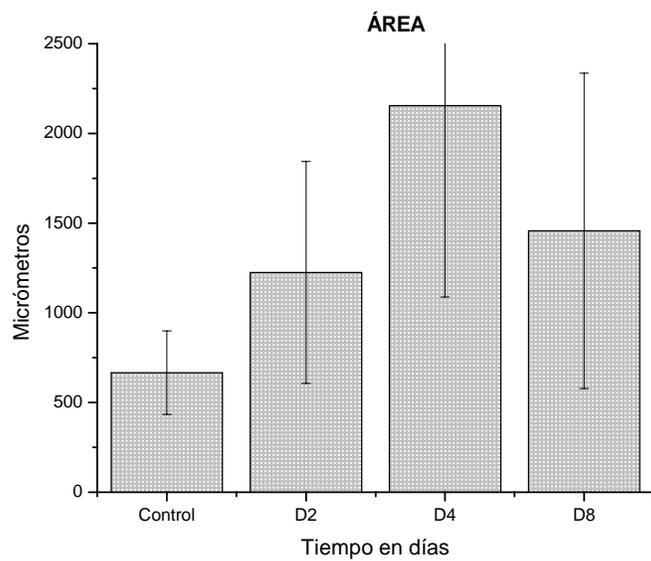
(PAS) intrafibrilar entre el día 0 y el día 2 pos tratamiento con una ( $P < 0.05$ ), siendo al día 2 cuando se observa un aumento en la cantidad del sustrato.

Cuadro 3. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo I del músculo femoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4, D8).

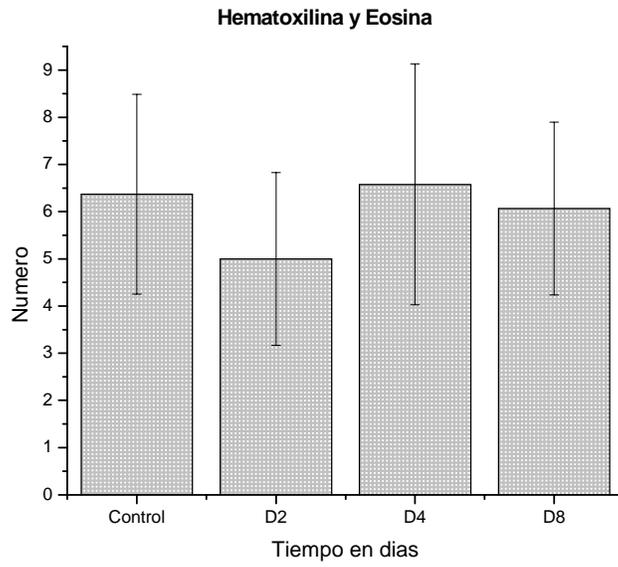
<b>M.FEMORAL</b>																
<b>FIBRAS I</b>																
Variable	<b>D0</b>				<b>D2</b>				<b>D4</b>				<b>D8</b>			
	Media	Desv. estan	Min	Max	Media	Desv. estan	Min	Max	Media	Desv. estan	Min	Max	Media	Desv. estan	Min	Max
<b>Núcleos</b>	<b>6.37</b>	2.1149	2	11	5	1.83	3	7	<b>6.577</b>	2.55	2	12	6.069	1.83	4	11
<b>Capilares</b>	<b>6</b>	1.3663	4	9	4.75	1.71	3	7	6.538	1.79	4	12	<b>7.381</b>	1.6	4	10
<b>GPDH</b>	<b>0.558</b>	0.0927	0.4	0.7	<b>0.62</b>	0.05	0.5	0.66	0.502	0.06	0.37	0.628	0.526	0.11	0.4	0.77
<b>SDH</b>	<b>0.5</b>	0.2602	0.1	0.8	0.75	0.06	0.7	0.82	<b>0.405</b>	0.13	0.17	0.601	0.605	0.05	0.52	0.75
<b>PAS</b>	<b>0.763</b>	0.1011	0.6	0.88	0.88	0.02	0.9	0.9	<b>0.779</b>	0.08	0.49	0.893	0.837	0.02	0.79	0.89
<b>Área</b>	<b>666.2</b>	233.28	324	1222	1225	619	423	1821	<b>2155</b>	1067	662	5105	1457	879	251	3698



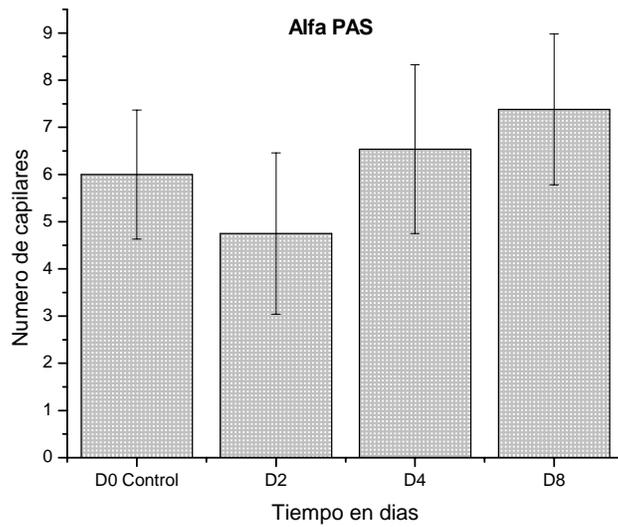
**Figura 12. Promedios de tipos fibrilares en el músculo femoral de pollos en el Grupo control (D0) y grupo tratado (D2, D4 y D8)**



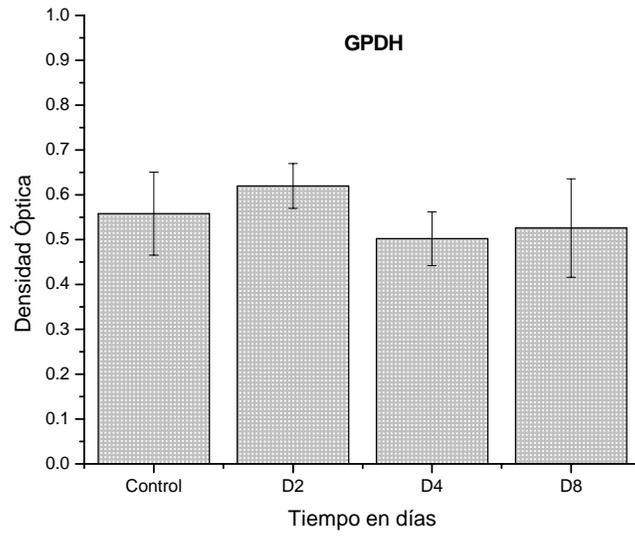
**Figura 13. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



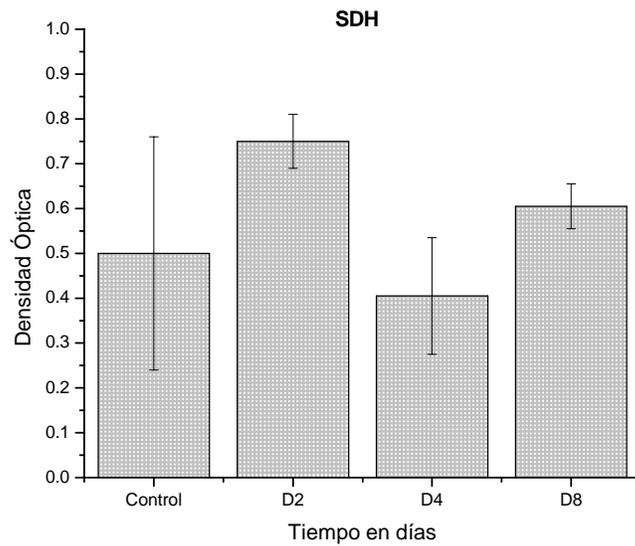
**Figura 14. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



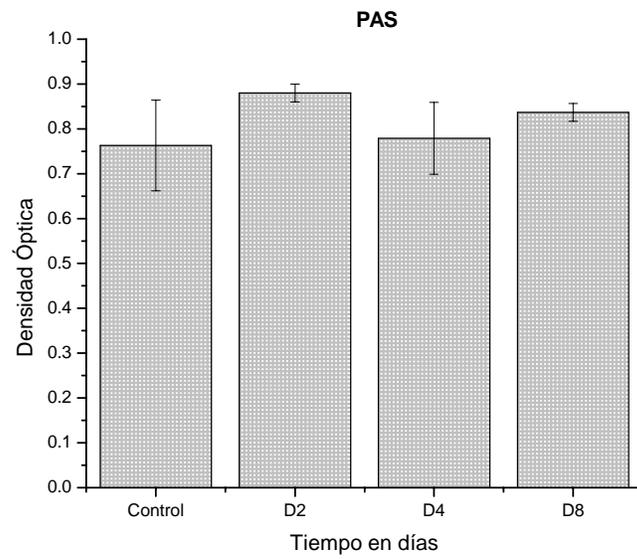
**Figura 15. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 16. Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 17. Promedios de la actividad oxidativa (SDH) de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 18. Promedios del contenido intrafibrilar de glucógeno (PAS) de las fibras tipo I del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**

## **Fibras tipo IIA**

El cuadro 4. Muestra los valores descriptivos de las características a) morfológicas (densidad de núcleos, de capilares y área transversal), b) metabólicas – actividad oxidativa (SDH), actividad glucolítica (GPDH) y concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) de las fibras tipo IIA del músculo femoral de 15 pollos estirpe Ross de 5 semanas incluidos en el grupo control (D0= 5n) y grupo tratado con carazolol (100 µg /kg) (D2, D4, D8= n10). Las medias se obtienen a partir de la cuantificación de 50 miofibras seleccionadas aleatoriamente en una zona carente de artefactos o de daño. La identificación es siempre de las mismas células y en cada una de las tinciones (morfológicas: HE, metabólicas: SDH, GPDH y PAS). Esta relación morfológica y metabólica permite clasificar a nivel celular el tipo celular (tipo IIA). El promedio de fibras tipo IIA del músculo femoral en el grupo control (D0 /n=5) fue de 6 fibras por observación (50 fibras observadas por muestra) (Figura 12). El área transversal promedio de estas fibras es en el grupo control (D0) fue de 549 µm<sup>2</sup>, mientras que el promedio de densidad nuclear fue de 5.49 núcleos y de capilares fue de 6 por fibra respectivamente (Figuras 19, 20 y 21). El promedio de actividad glucolítica GPDH en estas fibras fue de 0.602 Do (Figura 22), el de actividad oxidativa SDH 0.347 Do y la concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) fue de 0.68 Do (Figuras 23 y 24 respectivamente). El valor de referencia para la densidad óptica tiene un valor de 1 Do (blanco).

En el grupo tratado (n=10) se observó lo siguiente: Al día 2 pos tratamiento (D2) el promedio de fibras tipo I del músculo femoral fue de 13 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra). Al día 4 pos tratamiento (D4) el promedio de fibras tipo IIA del músculo femoral fue de 5 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra) siendo el promedio más elevado (Figura 12). Además en el grupo tratado el promedio más alto de densidad nuclear fue de 6.33 núcleos por fibra al día 4 post tratamiento (D4) (Figura 20). El promedio más alto de densidad capilar fue de 7.66 capilares por fibra al día 4 post tratamiento (D4). El promedio más alto de área transversal fue 3259 µm<sup>2</sup> y se observa al día 4 post- tratamiento (D4) (Figuras 21 y 19). La menor actividad glucolítica (GPDH) 0.62 Do, se observó al día 2 post-tratamiento (D2) (Figura 22), mientras que la mayor actividad oxidativa (SDH) fue de 0.511 Do al día 4 post

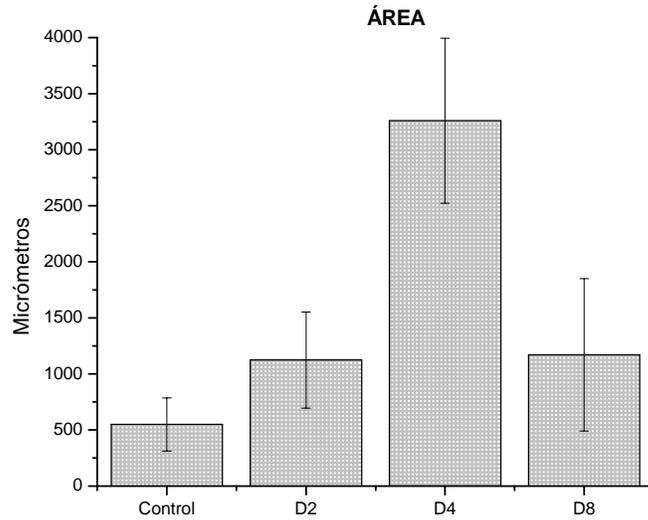
tratamiento (D4) (Figura 23). La concentración más alta de glucógeno intrafibrilar fue de 0.88 Do alcanzada al día 2 pos tratamiento (D2) (Figura 24).

### **ESTADISTICA**

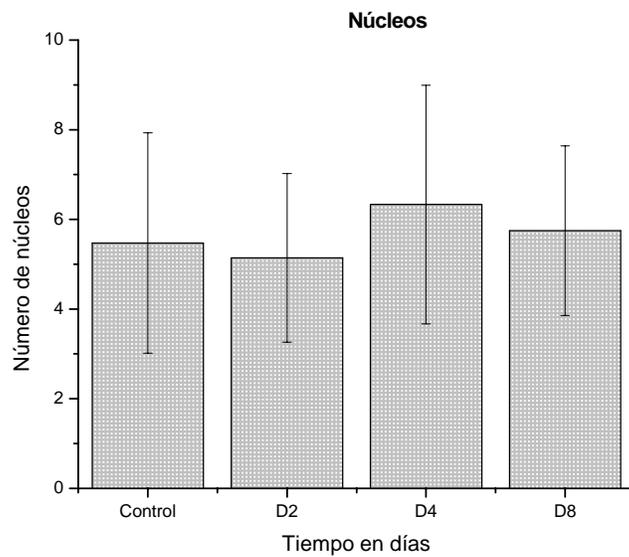
En las fibras tipo IIa, no se encuentran diferencias significativas en relación al grupo control con una ( $P < 0.05$ ), en cuanto a núcleos, ni capilares. Se observa una mayor diferencia estadísticamente significativa con una ( $P < 0.05$ ) en el tamaño transversal de las fibras observándose al día 4 pos tratamiento en relación al día 0. En relación al GPDH se puede notar una diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre el día 0 y el día 8 pos tratamiento indicando una menor actividad glucolítica hacia este día. En cuanto a SDH se observa una diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los días 0 y 2 pos tratamiento observándose una menor actividad metabólica al día 2 después de la administración del carazolol. Por otra parte se observa una mayor diferencia estadística en cuanto a la cantidad de glucógeno (PAS) intrafibrilar entre el día 0 y el día 2 pos tratamiento con una ( $P < 0.05$ ). Siendo al día 2 cuando se observa un aumento en la cantidad del sustrato.

4. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo IIA del músculo femoral del pollo del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4, D8).

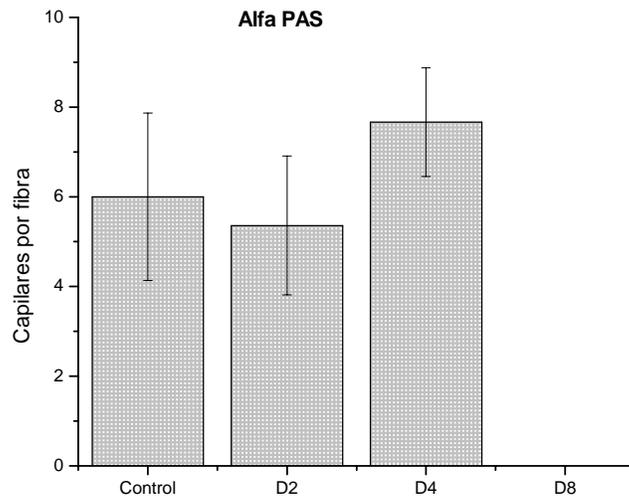
<b>M. FEMORAL</b>																
<b>FIBRAS IIA</b>																
	<b>DO</b>				<b>D2</b>				<b>D4</b>				<b>D8</b>			
<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estan</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estan</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estan</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estan</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Núcleos</b>	5.474	2.4578	2	12	5.14	1.88	2	10	6.333	2.66	2	9	5.75	1.89	3	7
<b>Capilares</b>	6	1.8708	4	8	5.36	1.55	3	8	7.667	1.21	6	9	.	.	.	.
<b>GPDH</b>	0.602	0.0691	0.5	0.69	0.6	0.06	0.5	0.7	0.484	0.08	0.35	0.587	0.457	0.04	0.41	0.5
<b>SDH</b>	0.347	0.1983	0.1	0.73	0.69	0.09	0.5	0.82	0.511	0.13	0.25	0.583	0.643	0.12	0.54	0.76
<b>PAS</b>	0.686	0.0948	0.6	0.85	0.87	0.02	0.8	0.9	0.791	0.05	0.76	0.88	.	.	.	.
<b>Área</b>	549	236.62	309	1212	1124	429	462	2185	3259	737	2369	4260	1170	679	279	1842



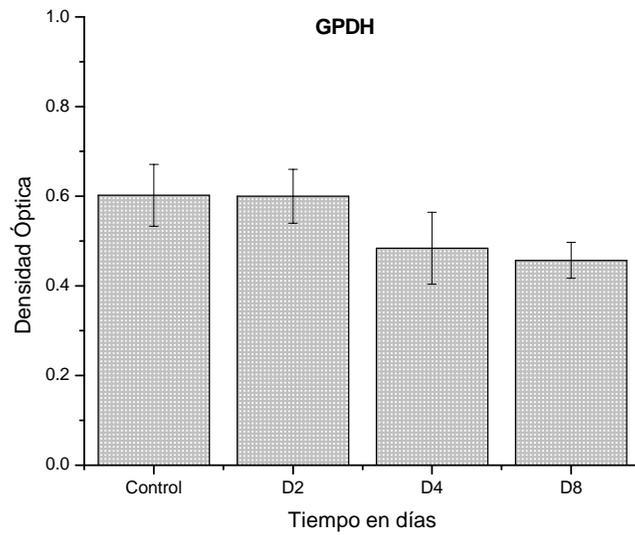
**Figura 19. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo II A del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



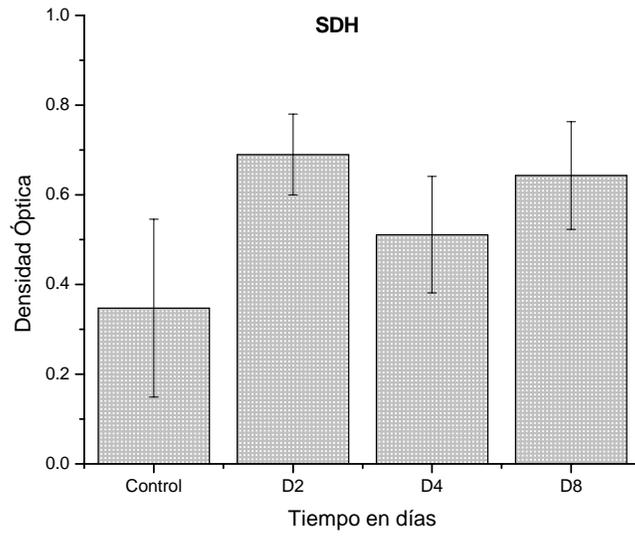
**Figura 20. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



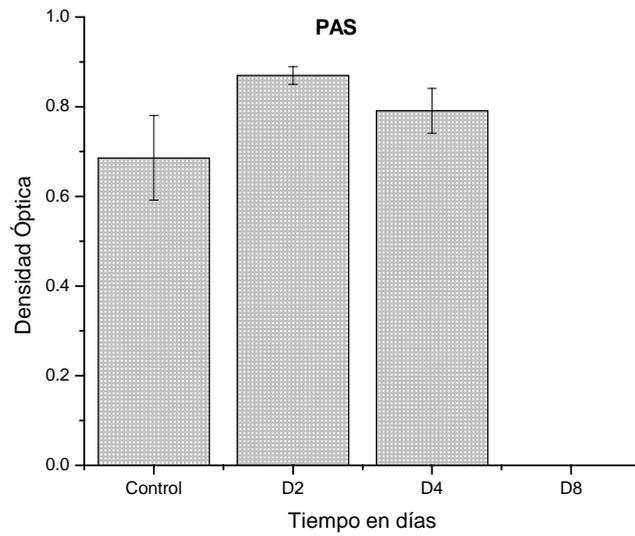
**Figura 21. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 22. Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 23. Promedios de la actividad oxidativa de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 24. Promedios de la concentración intrafibrilar de glucógeno Do de las fibras tipo IIA del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).**

### **Fibras tipo IIB**

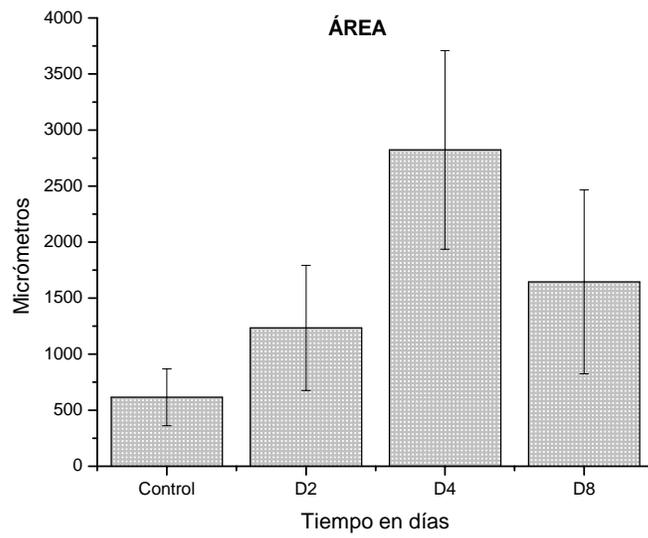
El cuadro 5 muestra los valores descriptivos de las características a) morfológicas (densidad de núcleos, de capilares y área transversal), b) metabólicas – actividad oxidativa (SDH), actividad glucolítica (GPDH) y concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) de las fibras tipo IIB del músculo femoral de 15 pollos estirpe Ross de 5 semanas incluidos en el grupo control (D0= 5n) y grupo tratado con carazolol (100 µg /kg) (D2, D4, D8= n10). Las medias se obtienen a partir de la cuantificación de 50 miofibras seleccionadas aleatoriamente en una zona carente de artefactos o de daño. La identificación es siempre de las mismas células y en cada una de las tinciones (morfológicas: HE, metabólicas: SDH, GPDH y PAS). Esta relación morfológica y metabólica permite clasificar a nivel celular el tipo celular (tipo IIB). El promedio de fibras tipo IIB del músculo femoral en el grupo control (D0 /n=5) fue de 35 fibras por observación (50 fibras observadas por muestra) (Figura 12). El área transversal promedio de estas fibras es en el grupo control (D0) fue de 615 µm<sup>2</sup> (Figura 25), mientras que el promedio de densidad nuclear fue de 5.72 núcleos y de capilares fue de 5.17 por fibra respectivamente (Figuras 26 y 27 respectivamente) El promedio de actividad glucolítica GPDH en estas fibras fue de 0.577 Do, el de actividad oxidativa SDH 0.486 Do y la concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) fue de 0.753 Do (Figuras 28, 29 y 30). El valor de referencia para la densidad óptica tiene un valor de 1 Do (blanco). En el grupo tratado (n=10) se observó lo siguiente: Al día 2 pos tratamiento (D2) el promedio de fibras tipo IIB del músculo femoral fue de 33 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra). Al día 4 pos tratamiento (D4) el promedio de fibras tipo IIB del músculo femoral fue de 17 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra) y al día 8 post tratamiento (D8) fue de 28 (Figura 12). En el grupo tratado el promedio más alto de densidad nuclear fue de 6.4 núcleos por fibra al día 4 post tratamiento (D4) (Figura 26). El promedio más alto de densidad capilar fue de 7.31 capilares por fibra al día 8 post tratamiento (D8) (Figura 27). El promedio más alto de área transversal fue 2823 µm<sup>2</sup> y se observa al día 4 post- tratamiento (D4) (Figura 25). La menor actividad glucolítica (GPDH) 0.59 Do, se observó al día 2 post-tratamiento( D2) (Figura 28), mientras que la mayor actividad oxidativa (SDH) fue de 0.48 Do al día 4 post tratamiento (D4) (Figura 29). La concentración más alta de glucógeno intrafibrilar fue de 0.79 Do alcanzada al día 4 pos tratamiento (D4) (Figura 30).

## **ESTADISTICA**

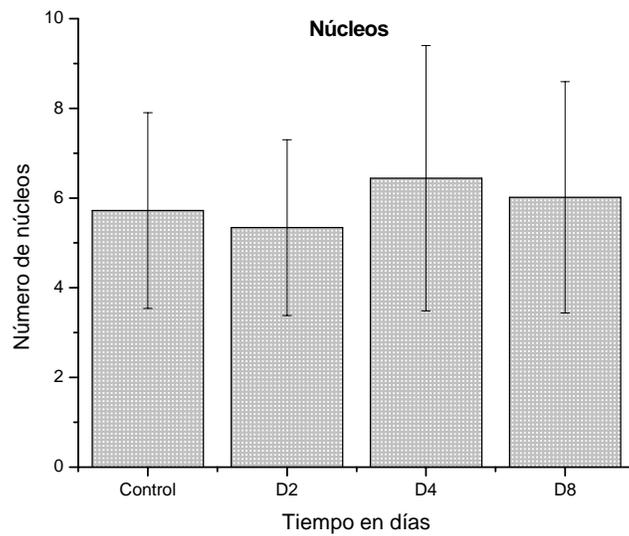
En las fibras tipo Iib, no se encuentran diferencias significativas en relación al grupo control con una ( $P < 0.05$ ), en el número de núcleos. En la densidad capilar con una ( $P < 0.05$ ) se observa una mayor cantidad hacia el día 8 en relación al día 0. En área transversal de las fibras se nota un aumento significativo con una ( $P < 0.05$ ) al día 4 en referencia al grupo control. En relación al GPDH se puede notar una diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre el día 0 y el día 4 pos tratamiento indicando una menor actividad glucolítica hacia este día. En cuanto a SDH se observa una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los días 0 y 2 pos tratamiento observándose una menor actividad metabólica al día 2 después de la administración del carazolol. Por otra parte se observa una mayor diferencia estadística en cuanto a la cantidad de glucógeno (PAS) intrafibrilar entre el día 0 y el día 8 pos tratamiento con una ( $P < 0.05$ ). Siendo al día 8 cuando se observa un aumento en la cantidad del sustrato.

Cuadro 5. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo IIB del músculo femoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4, D8).

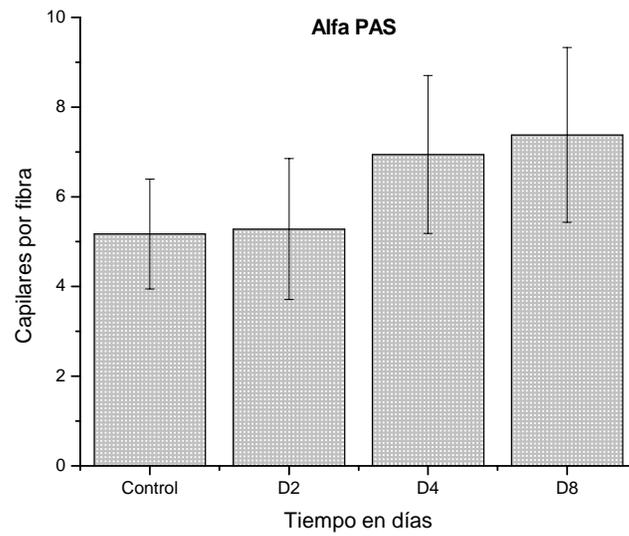
<b>M. FEMORAL</b>																
<b>FIBRAS IIB</b>																
	<b>DO</b>				<b>D2</b>				<b>D4</b>				<b>D8</b>			
<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estan</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estan</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estan</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estan</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Núcleos</b>	<b>5.722</b>	2.1841	2	12	5.34	1.96	2	10	<b>6.444</b>	2.96	2	14	6.015	2.58	1	13
<b>Capilares</b>	<b>5.172</b>	1.2268	3	8	5.28	1.57	3	8	6.944	1.76	4	11	<b>7.379</b>	1.95	4	11
<b>GPDH</b>	<b>0.577</b>	0.0887	0.4	0.73	<b>0.59</b>	0.05	0.5	0.7	0.478	0.06	0.35	0.587	0.511	0.09	0.37	0.72
<b>SDH</b>	<b>0.486</b>	0.2551	0.1	0.82	0.67	0.09	0.4	0.81	<b>0.482</b>	0.1	0.21	0.624	0.627	0.08	0.5	0.84
<b>PAS</b>	<b>0.753</b>	0.0977	0.5	0.88	0.85	0.05	0.7	0.92	<b>0.793</b>	0.06	0.68	0.871	0.848	0.03	0.77	0.89
<b>Área</b>	<b>615</b>	253.29	227	1256	1235	559	318	2916	<b>2823</b>	887	1379	4221	1645	821	201	3927



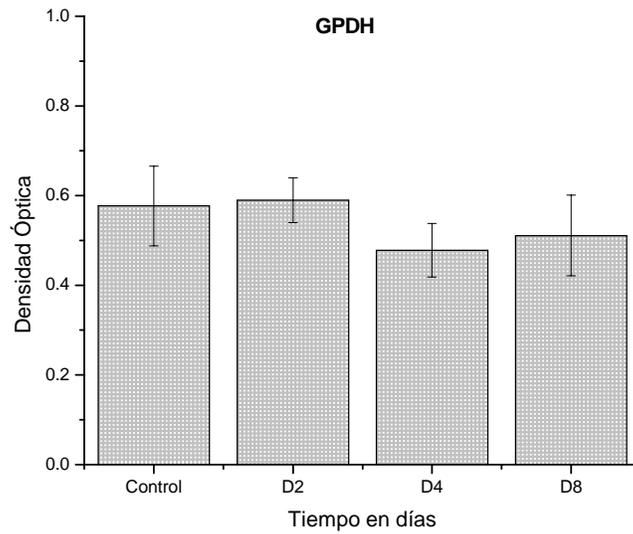
**Figura 25. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo II B del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



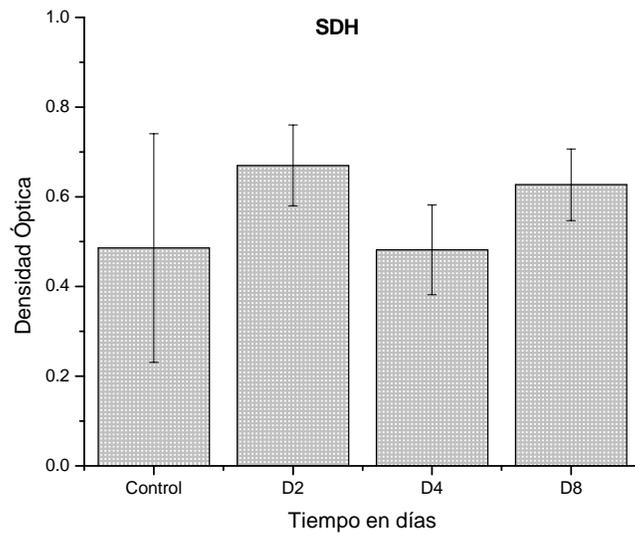
**Figura 26. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



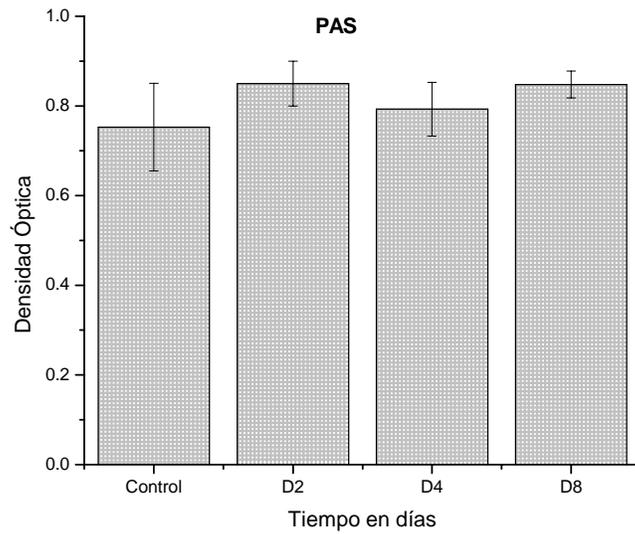
**Figura 27. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 28. Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 29. Promedios de la actividad oxidativa de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**



**Figura 30. Promedios de la concentración intrafibrilar de glucógeno Do de las fibras tipo IIB del M. femoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4, D8).**

## MUSCULO PECTORAL

Los resultados descriptivos del grupo control y tratado con carazolol de musculo pectoral se presentan en los cuadros y graficas correspondientes (Cuadros 6 a 8 y figuras 31 a 49).

**Fibras tipo I.** El cuadro 6 muestra los valores descriptivos de las características i) morfológicas (densidad de núcleos, de capilares y área transversal), ii) metabólicas – actividad oxidativa (SDH), actividad glucolítica (GPDH) y concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) de las fibras tipo I del músculo pectoral de 15 pollos estirpe Ross de 5 semanas incluidos en el grupo control (D0= 5n) y grupo tratado con carazolol (100 µg /kg) (D2, D4= n10). Las medias se obtienen a partir de la cuantificación de 50 miofibras seleccionadas aleatoriamente en una zona carente de artefactos o de daño. La identificación es siempre de las mismas células y en cada una de las tinciones (morfológicas: HE, metabólicas: SDH, GPDH y PAS). Esta relación morfológica y metabólica permite clasificar a nivel celular el tipo celular (tipo I). El promedio de fibras tipo I del músculo pectoral en el grupo control (D0 /n=5) fue de 3 fibras por observación (50fibras observadas por muestra) (Figura 31). El área transversal promedio de estas fibras es en el grupo control (D0) fue de 3659 µm<sup>2</sup>, mientras que el promedio de densidad nuclear fue de 5 núcleos y de capilares fue de 6.5 por fibra respectivamente (Figuras 32, 33, 34). El promedio de actividad glucolitica GPDH en estas fibras fue de 0.423 Do (Figura 35), el de actividad oxidativa SDH 0.755 Do (Figura 36) y la concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) fue de 0.875 DO (Figura 37). El valor de referencia para la densidad óptica tiene un valor de 1 D.0 (blanco). En el grupo tratado (n=10) se observo lo siguiente: Al día 2 pos tratamiento (D2) el promedio de fibras tipo I del músculo pectoral fue de 7 fibras por observación (50fibras observadas por cada muestra). Al día 4 pos tratamiento (D4) el promedio de fibras tipo I del músculo pectoral subió a 20 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra) (Figura 31). Además en el grupo tratado el promedio más alto de densidad nuclear fue de 6.37 núcleos por fibra al día 2 post tratamiento (D2). El promedio más alto de densidad capilar fue de 6.30 capilares por fibra al día 4 post tratamiento (D4). El promedio más alto de área transversal fue 2433 µm y se

observa al día 2 post- tratamiento (D2) (Figuras 33, 34 y 32). La menor actividad glucolítica (GPDH) 0.63 Do, se observó al día 4 post-tratamiento( D4) (Figura 35), mientras que la mayor actividad oxidativa (SDH) fue de 0.65 Do al día 2 post tratamiento (D2) (Figura 36). La concentración de glucógeno intrafibrilar fue de 0.85 Do alcanzada al día 4 pos tratamiento (D4) (Figura 37).

### **ESTADISTICA**

En las fibras tipo I, no se encuentran diferencias significativas con una ( $P < 0.05$ ), en cuanto a número de núcleos, densidad capilar, en las densidades de GPDH, SDH y PAS. En cuanto al área transversal de las fibras se observa una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los días 0 y 4 pos tratamiento. Presentándose una reducción de tamaño más notable hacia el día 4 pos tratamiento.

**Cuadro 6. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo I del músculo pectoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4).**

<b>M. pectoral</b>												
<b>Fibras I</b>												
	<b>DO</b>				<b>D2</b>				<b>D4</b>			
<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Media</b>	<b>DE</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Med</b>	<b>DE</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Núcleos</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>6.37</b>	1.84	5	10	5.2	2.28	1	9
<b>Capilares</b>	<b>6.5</b>	3.53	4	9	4.75	1.58	3	7	<b>6.3</b>	1.55	3	9
<b>GPDH</b>	<b>0.42</b>	0.11	0.344	0.502	0.43	0.03	0.40	0.50	<b>0.63</b>	0.02	0.58	0.67
<b>SDH</b>	<b>0.75</b>	0.01	0.74	0.76	0.65	0.07	0.54	0.74	<b>0.65</b>	0.02	0.60	0.70
<b>PAS</b>	<b>0.87</b>	0.00	0.87	0.88	.	.	.	.	<b>0.85</b>	0.02	0.82	0.88
<b>Área</b>	<b>3659</b>	28.28	3639	3679	<b>2433</b>	893.69	971.12	3697.57	1243.55	499.33	341.43	2298.99

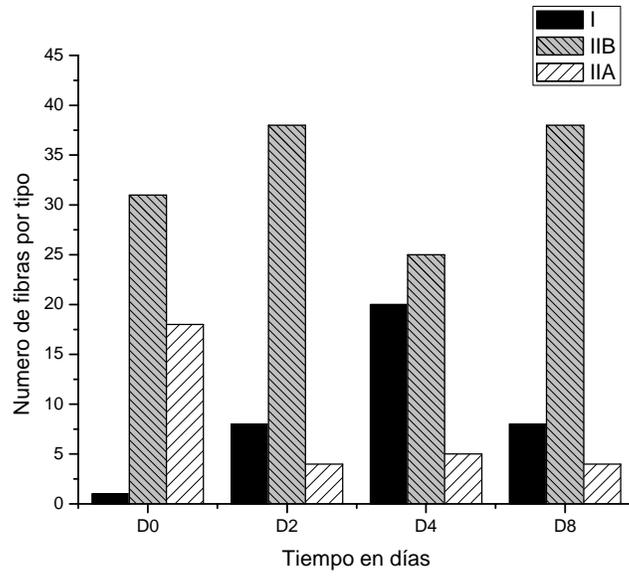


Figura 31. Promedios de tipos fibrilares en el músculo pectoral de pollos en el Grupo control (D0) y grupo tratado D2 y D4).

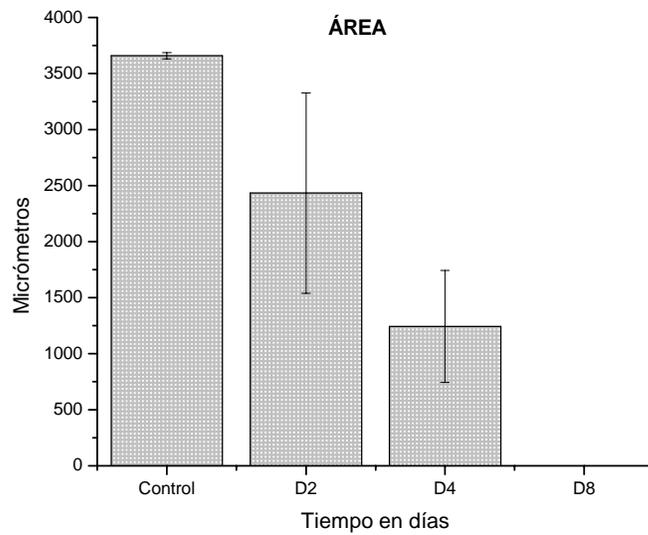
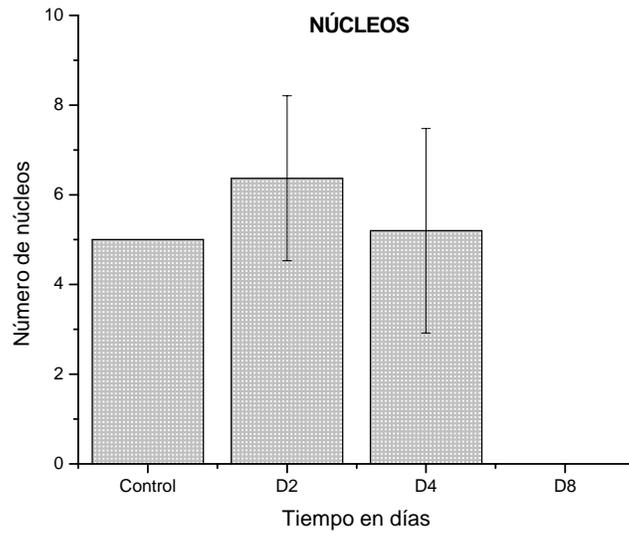
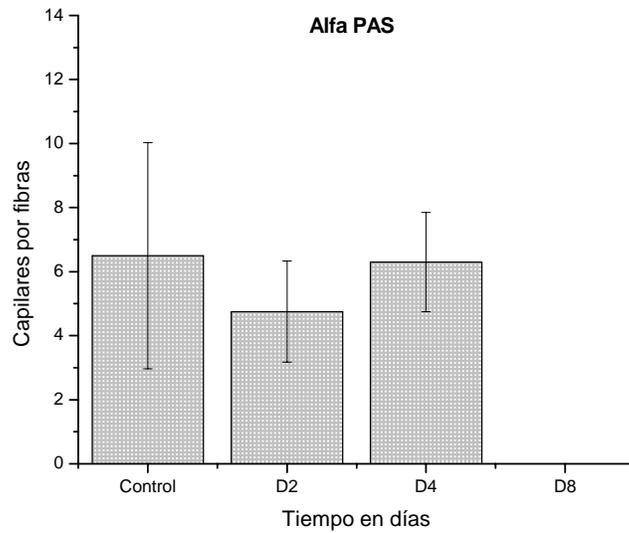


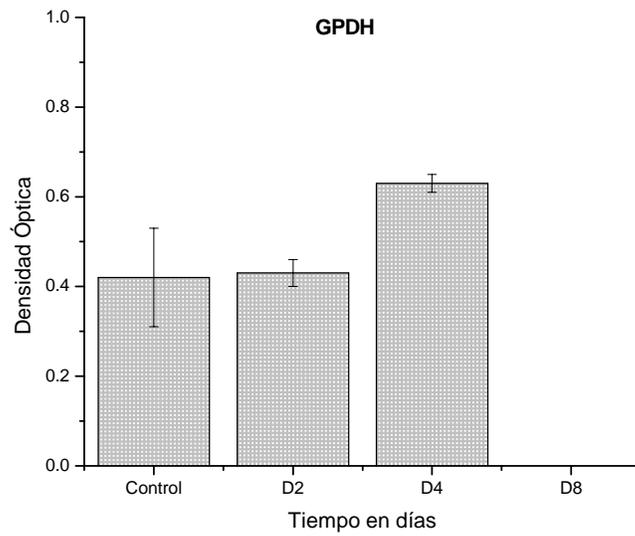
Figura 32. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).



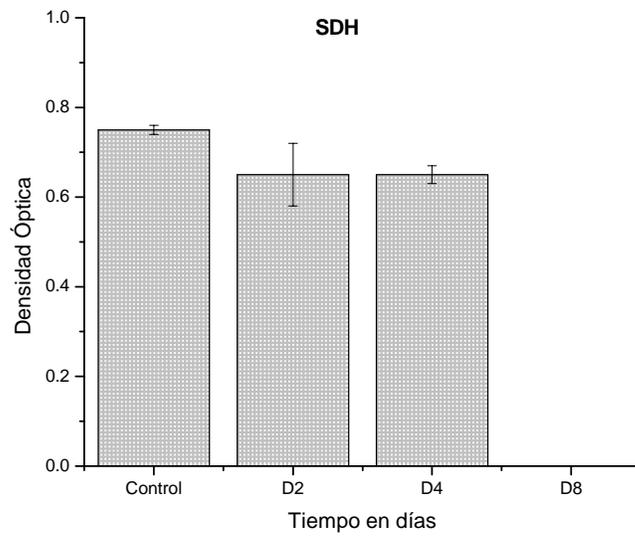
**Figura 33. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).**



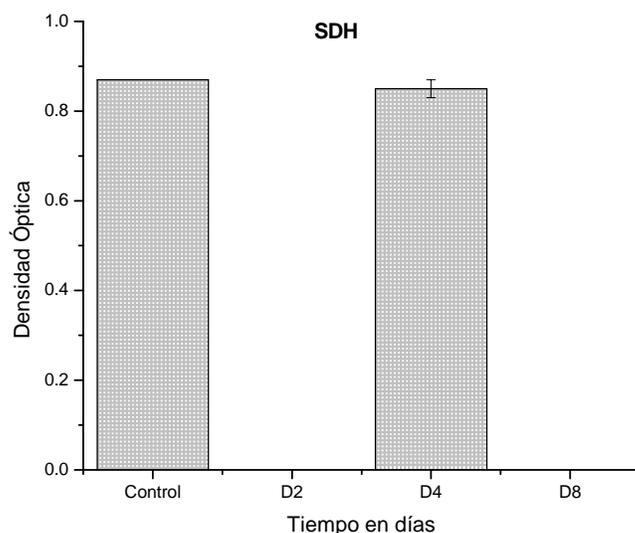
**Figura 34. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).**



**Figura 35. Promedios de la actividad glucolítica Do (GPDH) de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).**



**Figura 36. Promedios de la actividad oxidativa Do (SDH) de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).**



**Figura 37. Promedios del contenido intrafibrilar de glucógeno Do (PAS) de las fibras tipo I del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).**

### **Fibras tipo IIA**

El cuadro 7 muestra los valores descriptivos de las características i) morfológicas (densidad de núcleos, de capilares y área transversal), ii) metabólicas – actividad oxidativa (SDH), actividad glucolítica (GPDH) y concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) de las fibras tipo IIA del músculo pectoral de 15 pollos estirpe Ross de 5 semanas incluidos en el grupo control (D0= 5n) y grupo tratado con carazolol (100 µg /kg) (D2, D4= n10). Las medias se obtienen a partir de la cuantificación de 50 miofibras seleccionadas aleatoriamente en una zona carente de artefactos o de daño. La identificación es siempre de las mismas células y en cada una de las tinciones (morfológicas: HE, metabólicas: SDH, GPDH y PAS). Esta relación morfológica y metabólica permite clasificar a nivel celular el tipo celular (tipo IIA). El promedio de fibras tipo IIA del músculo pectoral en el grupo control (D0 /n=5) fue de 17 fibras por observación (50 fibras observadas por muestra) (Figura 31). El área transversal promedio de estas fibras en el grupo control (D0) fue de 2873.13 µm<sup>2</sup>, mientras que el promedio de densidad nuclear fue de 6.55 núcleos y de capilares fue de 6.45 por fibra respectivamente (Figura 38, 39 y 40).

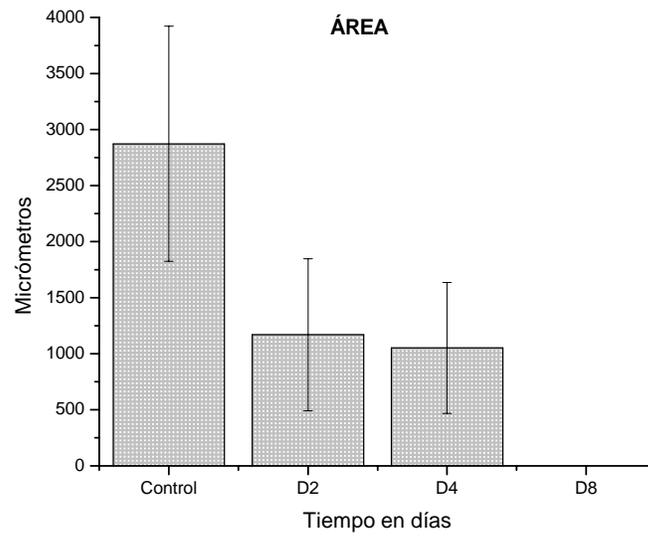
El promedio de actividad glucolítica GPDH en estas fibras fue de 0.422 Do (Figura 41), el de actividad oxidativa SDH 0.631 Do (Figura 42) y la concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) fue de 0.770 DO (Figura 43). El valor de referencia para la densidad óptica tiene un valor de 1 D.0. (Blanco). En el grupo tratado (n=10) se observó lo siguiente: Al día 2 pos tratamiento (D2) el promedio de fibras tipo IIA del músculo femoral fue de 3 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra). Al día 4 pos tratamiento (D4) el promedio de fibras tipo IIA del músculo pectoral aumentó a 5 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra) y al día 8 pos tratamiento (D8) el promedio de fibras tipo IIA del músculo pectoral fue de 4 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra) (Figura 31). Además en el grupo tratado el promedio más alto de densidad nuclear fue de 5.25 núcleos por fibra al día 2 post tratamiento (D2). El promedio más alto de densidad capilar fue de 6.00 capilares por fibra al día 2 post tratamiento (D2). El promedio más alto de área transversal fue  $1170\mu\text{m}^2$  y se observa al día 2 post- tratamiento (D2) (Figuras 39, 40, 38). La menor actividad glucolítica (GPDH) 0.64 Do, se observó al día 4 post-tratamiento( D4) (Figura 41), mientras que la mayor actividad oxidativa (SDH) fue de 0.64 Do al día 2 post tratamiento (D2) (Figura 42). La concentración de glucógeno intrafibrilar fue de 0.85 Do alcanzada al día 4 pos tratamiento (D4) (Figura 43).

## **ESTADISTICA**

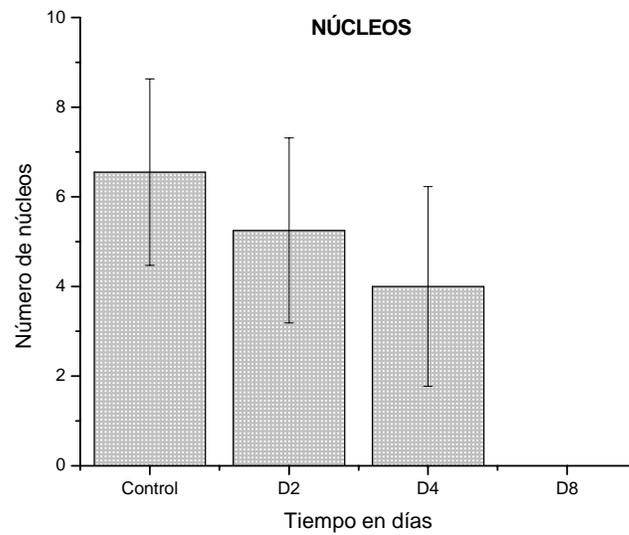
En las fibras tipo IIA, no se encuentran diferencias significativas con una ( $P < 0.05$ ), en cuanto a número de núcleos, densidad capilar, en las densidades de SDH y PAS. En cuanto al área transversal de las fibras se observa una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre los días 0 y 4 pos tratamiento. Presentándose una reducción de tamaño más notable hacia el día 4 pos tratamiento. En la actividad glucolítica (GPDH) se observa una reducción ( $P < 0.05$ ) en ésta en el día 4 pos tratamiento en relación al día 0.

7. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo IIA del músculo pectoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4).

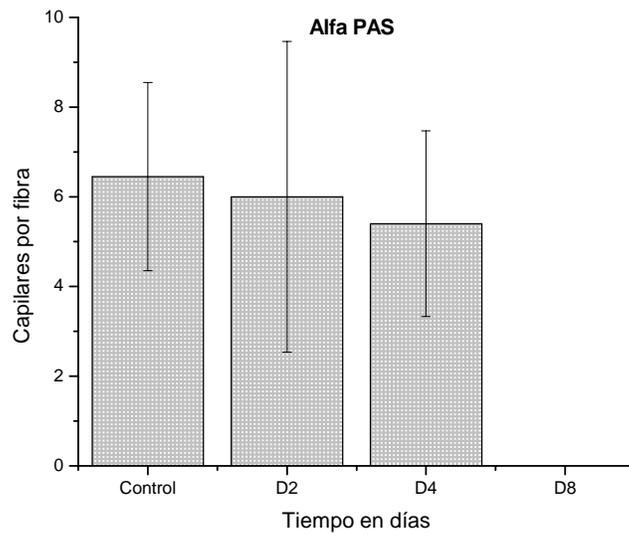
<b>M. pectoral</b>												
<b>Fibras IIA</b>												
	<b>D0</b>				<b>D2</b>				<b>D4</b>			
<b>Variable</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>
<b>Núcleos</b>	<b>6.55</b>	2.08	3	11	<b>5.25</b>	2.06	3	7	4	2.23	1	7
<b>Capilares</b>	<b>6.45</b>	2.10	4	12	<b>6</b>	3.464	3	11	5.4	2.071	3	8
<b>GPDH</b>	<b>0.42</b>	0.07	0.28	0.55	0.45	0.03	0.41	0.50	<b>0.64</b>	0.03	0.60	0.67
<b>SDH</b>	<b>0.63</b>	0.18	0.3	0.80	<b>0.64</b>	0.11	0.53	0.76	0.63	0.01	0.62	0.66
<b>PAS</b>	<b>0.77</b>	0.12	0.47	0.91	.	.	.	.	<b>0.85</b>	0.01	0.83	0.88
<b>Área</b>	<b>2873.13</b>	1048.64	708.98	5471	<b>1170.1</b>	678.59	279.27	1841.8	1052.11	585	451.33	1902.61



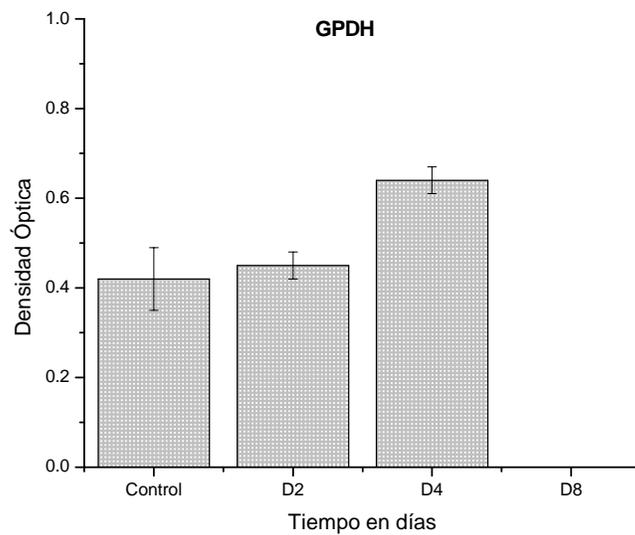
**Figura 38.** Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo II A del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).



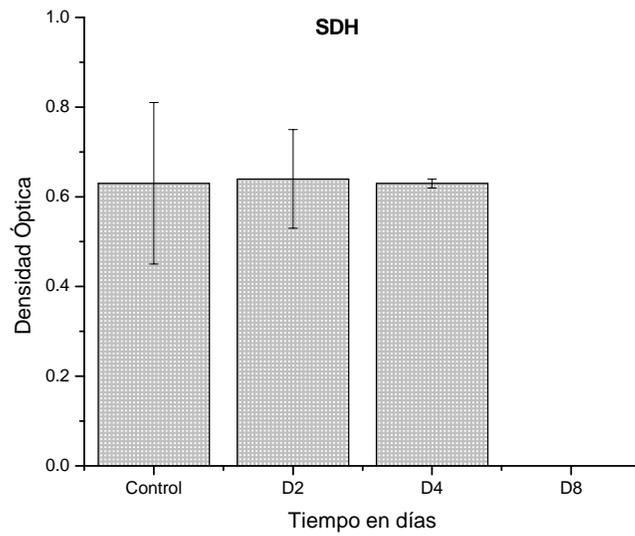
**Figura 39.** Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).



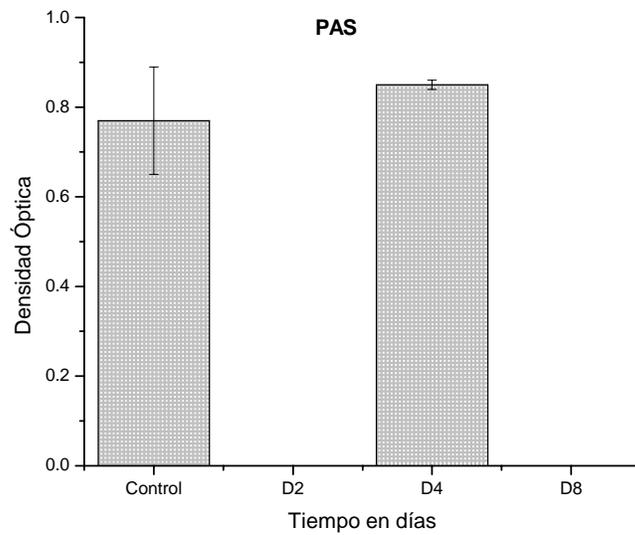
**Figura 40.** Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).



**Figura 41.** Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).



**Figura 42. Promedios de la actividad oxidativa de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).**



**Figura 43. Promedios de la concentración intrafibrilar de glucógeno Do de las fibras tipo IIA del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).**

### **Fibras tipo IIB**

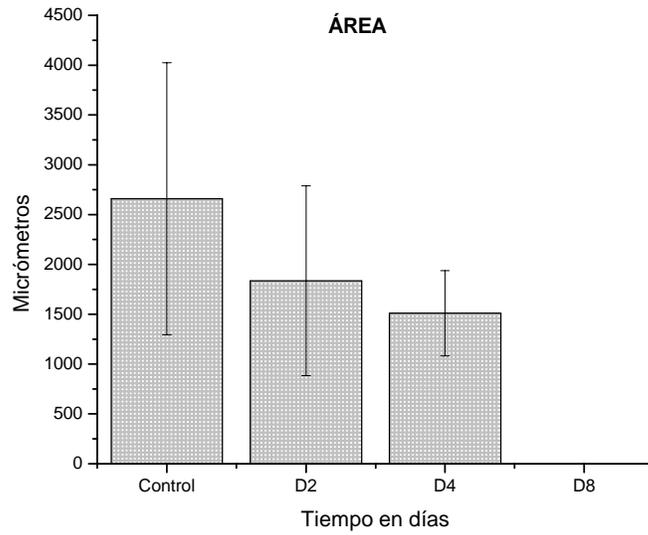
El cuadro 8 muestra los valores descriptivos de las características i) morfológicas (densidad de núcleos, de capilares y área transversal), ii) metabólicas – actividad oxidativa (SDH), actividad glucolítica (GPDH) y concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) de las fibras tipo IIB del músculo pectoral de 15 pollos estirpe Ross de 5 semanas incluidos en el grupo control (D0= 5n) y grupo tratado con carazolol (100 µg /kg) (D2, D4= n10). Las medias se obtienen a partir de la cuantificación de 50 miofibras seleccionadas aleatoriamente en una zona carente de artefactos o de daño. La identificación es siempre de las mismas células y en cada una de las tinciones (morfológicas: HE, metabólicas: SDH, GPDH y PAS). Esta relación morfológica y metabólica permite clasificar a nivel celular el tipo celular (tipo IIB). El promedio de fibras tipo IIB del músculo pectoral en el grupo control (D0 /n=5) fue de 30 fibras por observación (50 fibras observadas por muestra) (Figura 31). El área transversal promedio de estas fibras en el grupo control (D0) fue de 2659.07 µm<sup>2</sup>, mientras que el promedio de densidad nuclear fue de 6.31 núcleos y de capilares fue de 6.84 por fibra respectivamente (Figuras 44, 45, 46). El promedio de actividad glucolítica GPDH en estas fibras fue de 0.437 Do (Figura 47), el de actividad oxidativa SDH 0.530Do (Figura 48) y la concentración intrafibrilar de glucógeno (PAS) fue de 0.717 Do (Figura 49). El valor de referencia para la densidad óptica tiene un valor de 1 D.0. (Blanco). En el grupo tratado (n=10) se observó lo siguiente: Al día 2 pos tratamiento (D2) el promedio de fibras tipo IIB del músculo pectoral fue de 37 fibras por observación (50fibras observadas por cada muestra). Al día 4 postratamiento (D4) el promedio de fibras tipo IIB del músculo pectoral disminuyó a 25 fibras por observación (50 fibras observadas por cada muestra) (Figura 31). Además en el grupo tratado el promedio más alto de densidad nuclear fue de 5.72 núcleos por fibra al día 4 pos tratamiento (D4). El promedio más alto de densidad capilar fue de 6.68 capilares por fibra al día 4 pos tratamiento (D4). El promedio más alto de área transversal fue 1837 µm<sup>2</sup> y se observa al día 2 post- tratamiento (D2) (Figuras 45, 46, 44). La menor actividad glucolítica (GPDH) 0.632 Do, se observó al día 4 pos tratamiento (D4) (Figura 47), mientras que la mayor actividad oxidativa (SDH) fue de 0.655 Do al día 2 post tratamiento (D2) (Figura 48). La concentración de glucógeno intrafibrilar fue de 0.860 Do alcanzada al día 4 pos tratamiento (D4) (Figura 49).

## **ESTADISTICA**

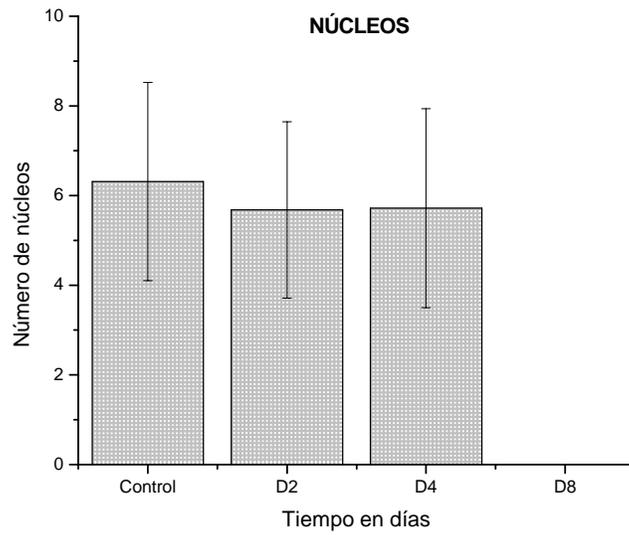
En las fibras tipo IIb, no se encuentran diferencias significativas en relación al grupo control con una ( $P < 0.05$ ), en cuanto a núcleos. En el número de capilares con una ( $P < 0.05$ ) se observa una menor cantidad hacia el día 2 en relación al día 0. En área transversal de las fibras se nota una reducción significativa con una ( $P < 0.05$ ) al día 4 en referencia al grupo control. En relación al GPDH se puede notar una diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) entre el día 0 y el día 4 pos tratamiento indicando una menor actividad glucolítica hacia este día. En cuanto a SDH se observa una diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los días 0 y 2 pos tratamiento en relación con el grupo control, observándose una menor actividad metabólica hacia los días 2 y 4 después de la administración del carazolol. Por otra parte se observa una diferencia estadística en cuanto a la cantidad de glucógeno (PAS) intrafibrilar entre el día 0 y el día 4 pos tratamiento con una ( $P < 0.05$ ). Siendo al día 4 cuando se observa un aumento en la cantidad del sustrato.

**Cuadro 8. Valores descriptivos de las características morfológicas y metabólicas de las fibras tipo IIB del músculo pectoral de pollos del grupo control (D0) y del grupo tratado con carazolol (D2, D4).**

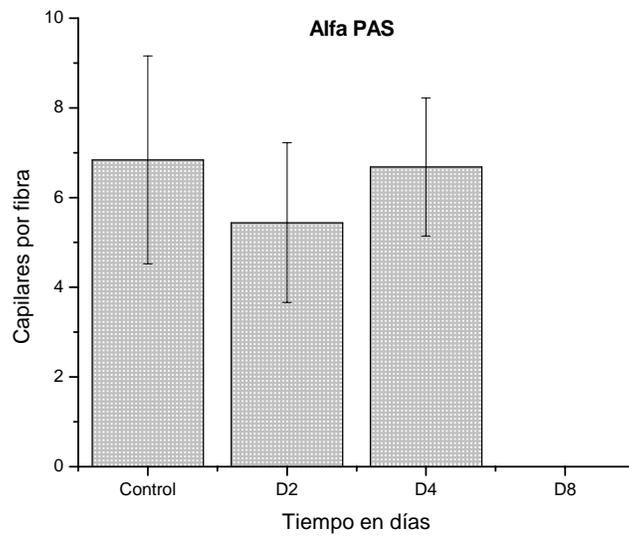
<b>M. pectoral</b>												
<b>Fibras IIB</b>												
	<b>D0</b>				<b>D2</b>				<b>D4</b>			
<b>Variable</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DE</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>
<b>Núcleos</b>	<b>6.31</b>	2.21	2	12	5.68	1.97	3	11	<b>5.72</b>	2.22	2	10
<b>Capilares</b>	<b>6.84</b>	2.32	3	12	5.44	1.78	3	8	<b>6.68</b>	1.54	4	10
<b>GPDH</b>	<b>0.43</b>	0.06	0.26	0.57	0.46	0.04	0.36	0.62	<b>0.63</b>	0.02	0.57	0.67
<b>SDH</b>	<b>0.53</b>	0.18	0.33	0.84	<b>0.65</b>	0.09	0.51	0.83	0.64	0.02	0.61	0.69
<b>PAS</b>	<b>0.71</b>	0.11	0.42	0.90	.	.	.	.	<b>0.86</b>	0.01	0.83	0.89
<b>Área</b>	<b>2659</b>	1364.2	421.6	6658	<b>1837</b>	953.02	201.34	3926.84	1510.31	428.18	546.8	2137.74



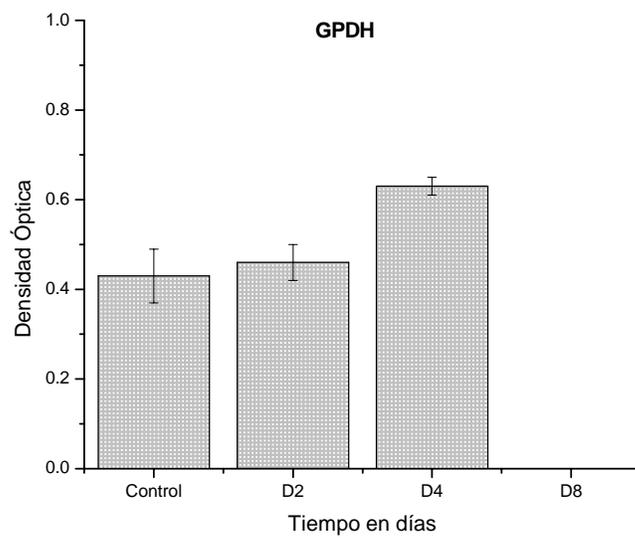
**Figura 44. Promedios del área transversal ( $\mu\text{m}^2$ ) de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).**



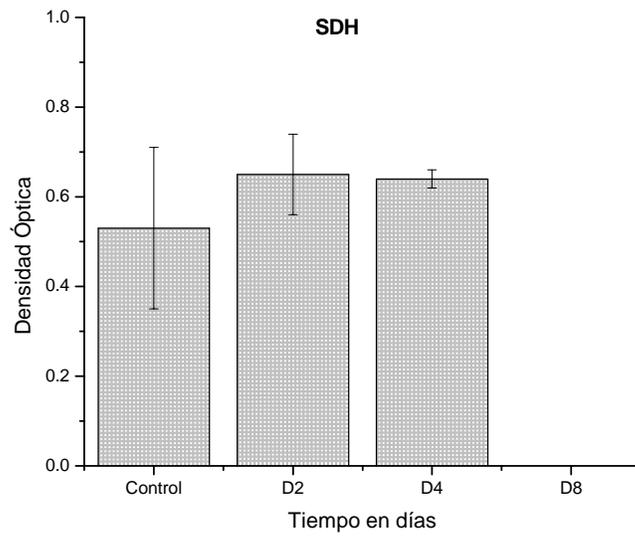
**Figura 45. Promedios de la densidad nuclear de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (D0) y grupo tratado (D2, D4).**



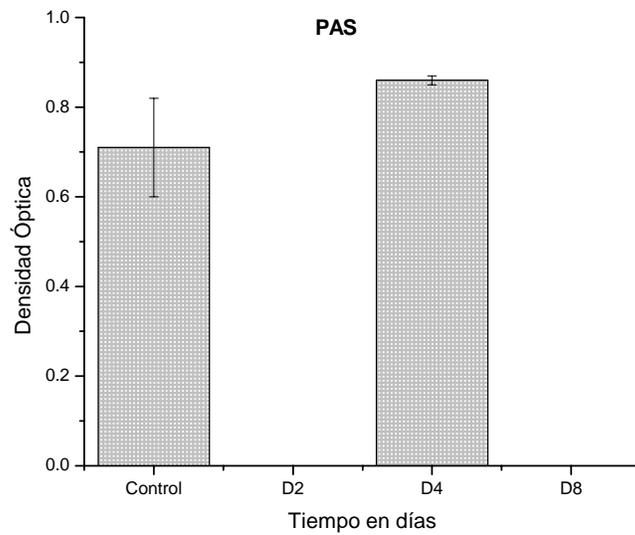
**Figura 46. Promedios de la densidad capilar de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).**



**Figura 47. Promedios de la actividad glucolítica (GPDH) de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).**



**Figura 48. Promedios de la actividad oxidativa de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).**



**Figura 49. Promedios de la concentración intrafibrilar de glucógeno Do de las fibras tipo IIB del M. pectoral de pollos de engorda. Grupo Control (Do) y grupo tratado (D2, D4).**

## VI. DISCUSION

El análisis morfofuncional del músculo esquelético aviar plantea un reto cuando se busca relacionar las características fenotípicas fibrilares (morfológicas, metabólicas y contráctiles) con las características organolépticas, higiénicas y de calidad de la carne (Le von Lengerken, 2002; Andersen y cols. 2005, Shear, 1971).

El objetivo general de este trabajo fue el conocer la heterogeneidad del fenotipo muscular (porcentaje y características contráctiles, metabólicas y morfológicas de las fibras musculares) de la estirpe Ross de pollos de engorda frente a un agente estresor (manejo) y conocer los mecanismos de adaptabilidad de este tejido en animales tratados con carazolol

El estudio histológico e histoquímico del tejido muscular permitió conocer las características morfológicas (área transversal fibrilar, la densidad de núcleos y de capilares), concentración de sustrato energético (glucógeno intrafibrilar) y actividades enzimáticas mitocondriales relacionadas con el metabolismo energético (actividad succinildeshidrogenasa -SDH y la glicerol fosfato deshidrogenada GPDH) y velocidad de contracción (mATPasa con pre incubación a 4,6 pH) (Kandel y cols. 2000, Belcastro y cols.1998; Blanco y cols. 1988; Dunshea y cols. 2005).

El uso combinado de estas tinciones permitió la clasificación de tres tipos de fibras musculares tanto en el músculo pectoral como en el femoral del pollo en tipo I y tipos IIA y IIB (Bottinelli y Reggiani, 2000; Pette y Staron, 1990, Torrella y cols. 1998). La población fibrilar en ambos músculos es heterogénea (variación topográfica y por especificidad) aunque existe una mayor proporción de fibras II B en el músculo femoral y de II A en el músculo pectoral (Figuras 12 y 31), al respecto se ha descrito que el costo energético en ambos es muy alto y tienden fácilmente a la acidosis metabólica (Mahon,1984) (ver cuadros 3 a 8 y figuras 12 a 49).

Las fibras tipo I tanto en el músculo femoral como en el pectoral tienen una mayor área transversal, mayor densidad nuclear y capilar, mayor actividad oxidativa (cuadros 3, 6 ; Figuras 13, 14 ,15, 17 y 18) y menor concentración intrafibrilar de glucógeno (Scott y cols. 2001; McKee y cols.1981; Mammoli y cols.2004; Henckel y cols. 1998; McKee y cols. 1997). Sin embargo, la actividad glucolítica es muy semejante a la de las fibras II A y B

(Figura 16). Las fibras musculares tipo II presentan características inversas a las fibras tipo I (cuadros 4, 5, 7 y 8) es de resaltar el mayor contenido intrafibrilar de glucógeno (tipo IIA) y mayor actividad glucolítica (tipo IIA y IIB).

Los pollos tienen proporcionalmente más fibras de tipo II presentando una mayor susceptibilidad en desarrollar una rápida actividad glucolítica (cuadros 3 a 8) relacionada con el estrés lo que promueve una carne pálida, suave y exudativa (PSE). Se han observado disminuciones en los valores de pH, y además que las canales aumentan sus temperaturas produciéndose una rápida desnaturalización de las proteínas de este producto alimenticio (Offer, 1991; McKee y Sams 1998). La composición intrafibrilar de glucógeno y las variaciones en la reacción de glucólisis (cuadros 3 a 8) ante-mortem se ha relacionado con factores que condicionan los atributos organolépticos de la carne de pollo (von Lengerken y cols. 2002; Lefaucheur y cols. 2000). Entre los factores que modifican el metabolismo muscular (p.e: la actividad glucolítica) están aquellos relacionados con el manejo (Shackelford y cols. 1999; Gunning y Hardeman, 1991). En este trabajo los animales tuvieron diferentes manejos durante una semana (alimentación y limpieza del alojamiento), considerando estos como hechos estresantes, se decidió evaluar las características morfológicas, metabólicas y contráctiles del fenotipo muscular provocadas por esta situación. Este factor y aquellos involucrados en el transporte y sacrificio condicionan la aparición del síndrome de estrés aviar (SSA) (Stephan, 1993) cuyo resultado es carne pálida, suave y exudativa (PSE) (McKee y Sams, 1997; Sosniki y Wilson, 1991). Esta alteración en la calidad cárnica se atribuye entre otros a un descenso importante del pH, y aumento del lactato (lo que se relaciona con el aumento de la actividad glucolítica) (Choe y cols. 2008, Baynes y Dominiczack, 1999).

Así mismo, las variaciones en la concentración de glucógeno intrafibrilar se han relacionado con manejo de las aves, privación de alimento, transporte, y/o métodos de sacrificio. La concentración intrafibrilar de glucógeno en el grupo control fue menor y la actividad glucolítica mayor en términos generales comparando el grupo control con el grupo tratado, lo cual se debe muy probablemente a una acción catecolaminérgica y del cortisol, el que aumenta debido al manejo (estrés) al que son expuestos los animales (Wittmannet y cols.1994; Fischery y Dobrowolski, 2002).

A menor actividad glucolítica se mantiene el pH final de la carne y mayor cantidad de agua almacenada mejorando así la textura de la carne (Lefaucheur y cols. 1991; Enfält y cols.1997). Además el glucógeno intrafibrilar influye sobre el almacenamiento de agua en el músculo (Young y cols.2002; Lefaucheur y cols. 1991). Por otro lado, la respuesta muscular al estrés producido por el transporte y antes del sacrificio en cerdos y ganado bovino induce variaciones en la población fibrilar tipo (I y II) provocando este hecho la depleción de glucógeno afectando de manera secuencial a las fibras I, IIA y IIB (Essén-Gustavsson, 1992; Fernández y cols., 1995; Warriss, 2000). El estrés psicológico relacionado con cambios en el medio ambiente induce a la liberación de catecolaminas (Henckel et al., 2002; Tarrant y Lacourt, 1984; Immonen y cols. 2000) las cuales estimulan la glucógenolisis en cerdos y ganado bovino (Monin, 2004).

La glucolisis postmortem se puede detener por deficiencia de AMP (Scopes, 1971), acortamiento de ADP, regulación de glucosa (van Laack et al., 2001) o inhibición de las enzimas glucolíticas que causan disminución del pH (Lundberg y cols. 1987; Pearson y cols. Young, 1989).

El carazolol es un bloqueador selectivo de los adrenoreceptores postsinápticos  $\beta_3$ . Ejerce un efecto inhibitorio de la acción de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), de la adenilciclase y del AMPc (Mejean y cols.1995; Rudloff y cols. 1984). Tanto en el músculo pectoral como en el femoral el carazolol previene la activación del metabolismo energético provocado por las catecolaminas reduciendo así la actividad glucolítica en general al día 2 pos tratamiento tanto en las fibras I y II aumentando la concentración de glucógeno intrafibrilar entre los días 4 y 8 post tratamiento (véase cuadros 3 a 8 y figuras 12 a 49)este efecto descrito en otras especies (Menjean y cols.1995, Gregory y cols. 1982; Kadir y cols. 1990) también se refleja y corrobora en el pollo de engorda en este trabajo. La administración de carazolol también provoca en términos generales un aumento del área transversal fibrilar y las densidades nucleares y capilares tanto en fibras I y II entre los días 4 y 8 post tratamiento. La actividad oxidativa disminuye en ambos tipos de fibras entre los días 4 y 8 pos tratamiento tal como lo informaron Menjean y cols.1995; Rudloff y cols. 1984; Gregory y cols. 1982; Kadir y cols. 1990.

Como se mencionó, la dosis recomendada por vía intramuscular en bovinos y cerdos es de 1 mg /100 kg. Administrado por vía oral logra una absorción en el tracto gastrointestinal

(Abshagen y cols.1980; Moloney y cols.1990), sin embargo su biodisponibilidad oral es de aproximadamente el 10 % por lo que se requieren 10 veces más dosis por vía oral que por vía parenteral para lograr el mismo efecto (Mejean y cols.1995, Gregory y cols. 1982; Kadir y cols. 1990). Lo cual se ve reflejado en los resultados aquí presentados.

## **VII. CONCLUSION**

Si bien el manejo en las explotaciones avícolas actuales es mínimo se debe considerar a este como un factor de estrés junto con las condiciones de transporte y sacrificio, las cuales afectarán en consecuencia la calidad cárnica de esta especie. El uso por vía oral del carazolol parece tener ciertos efectos sobre las principales vías metabólicas a nivel muscular (glucolítica y oxidativa), reduciendo la actividad glucolítica y sus efectos de disminución del pH y formación de lactato. Los resultados obtenidos en este trabajo, se deben considerar como una contribución básica para que se puedan utilizar en estudios futuros en el músculo esquelético y poder confirmar tanto a nivel celular como molecular la efectividad de este fármaco en cuanto a su capacidad para disminuir los procesos que causan detrimento en la calidad de carne de pollo disminuyendo las pérdidas económicas inherentes a la industria avícola.

Dada las características y finalidades para las que fue diseñado el carazolol se concluye que no hay efecto inmediato (menor a 2 días) sobre la morfología de las fibras musculares, pero el efecto en el metabolismo es evidente desde los 2 días pos administración, por lo que concluimos que es un fármaco que puede ayudar a mantener las características morfológicas y metabólicas de las fibras musculares del pollo de engorda en condiciones de estrés por transporte.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abshagen, U. and Von Mollendorf, E. (1980). Pharmakokinetik oder Wirkungskinetik von Carazolol? Therapierelevante Daten. In: Symposium über den Beta-Rezeptorenblocker Carazolol. 8-9 Februar 1980 München. Submitted to WHO by Praemix Wirkstoff GMBH, Mannheim, Germany.
2. Aherne y Dunhill, M.S (1982). Morphometry. Edward Arnold. London.
3. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to receptors and channels (GRAC) nd.edition(2007 revision). Br J Pharmacol 150 (Suppl.1):S1-S168, 2007
4. Andersen, H. J., Oksbjerg, N., Young, J. F., & Therkildsen, M. (2005). Feeding and meat quality – A future approach. Meat Science, 70, 543–554.
5. Andreus F.M. y Spurgeon, 1986. Histochemical staining characteristic of normal horse skeletal muscle. Am. J. Vet. Res. 47,1843-1852.
6. Ashmore, C. R. (1974). Phenotypic expression of muscle fiber types and some implications to meat quality. Journal of Animal Science, 38, 1158–1164.
7. Ashmore, C. R., & Doerr, L. (1971). Comparative aspects of muscle fiber types in different species. Experimental Neurology, 31, 408–418
8. Avendaño-Reyes L, Torres –Rodriguez V, Meraza-Murillo FJ, Pérez Linares C, Figueroa-Saavedra F, Robinson PH. Effect of two beta adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meta quality of feedlot steers. J. Anim Sci. 84:3259-65,2006
9. Bancroft, S.D., Stevens, A.: Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. Edinburgh (2nd ed.). 1982, p: 662.
10. Barbut, S. (1997). Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. British Poultry Science, 38(4), 355-358.
11. Blanco CE, Sieck GC (1992) Quantitative determination of calciumactivated myosin adenosine triphosphatase activity in rat skeletal muscle fibres. Histochem J 24:431-444
12. Blanco CE, Sieck GC, Edgerton VR (1988) Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres. Histochem J 20:230-243
13. Barnard, E.A., Lyles, J.M., Pizzey, J.A.: Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy. J. Physiol., 1982; 331: 333-354.
14. Bartsch, K. Dietmann, H. Leinert and G. Sponer , Cardiac action of carazolol and methypranol in comparison with other  $\beta$ -receptor blockers. Arzneim.-Forsch. 27 (1977), p. 1022
15. Baynes, J., & Dominiczak, M.H. (1999). Medical Biochemistry. Barcelona: Grafos SA.
16. Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. 1998.Mol Cell Biochem 179:135- 145.
17. Berchtold MW, Brinkmeir H, Müntener M Calcium ion inskeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. 2000.Physiol Rev 80:1215-1265.
18. Bergström, J., Guarnieri, G., & Hultman, E. (1971). Carbohydrate metabolism and electrolyte changes in human muscle tissue during heavy work. Journal of Applied Physiology: respiratory, environmental and exercise physiology, 30(1), 122-125.
19. Berri, C. et al. (2004). Technological quality of broiler breast meat in relation to muscle hypertrophy. In Proceedings of the 50th International Congress on Meat Science and Technology (pp. 93-96). 8-13 August, Helsinki, Finland.
20. C. Berri, I N. Wacrenier, N. Millet, and E. Le Bihan-Duval Effect of Selection for Improved Body Composition on Muscle and Meat Characteristics of Broilers from Experimental and Commercial Lines. 2001 Poultry Science 80:83

21. Bottinelli and C. Reggiani, Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 73 (2000), pp. 195–262
22. Booth FW, Baldwin KM (1996) Muscle plasticity: energy demand and supply processes. In:
23. Rowell LB, Shepherd JT (eds) *handbook of physiology*. American Physiological Society, Bethesda, Md. pp. 1075-1123
24. Bourne G H. editor. *The structure and function of muscle*. Academic Press 1972
25. Braund K.G; McGuire, J.A and Lincoln C.E.(1982). Observations on normalskeletal muscle of mature dogs. A cytochemical, histochemical and morphometric study. *Vet. Pathol.*19,577-595.
26. Brooke, M. H., & Kaiser, K. K. (1970). Muscle fiber types: How many and what kind? *Archives of Neurology*, 23, 369–379.
27. Burke, W.H., and M.H. Henry. 1997. Characteristics of the Pectoralis superficialis and semimembranosus of broiler strain chickens, bantam chickens, and the reciprocal crosses. *Poultry Sci.* 76:767-773.
28. Chiang, W., M.B. Solomon, and K.L. Kotula. 1995. Muscle fiber types of selected muscles from broiler chickens in relation to age and sex. *J. Muscle Food* 6:197-210.
29. Choe, J. H., Choi, Y. M., Lee, S. H., Shin, H. G., Ryu, Y. C., Hong, K. C., et al. (2008). The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality. *Meat Science*, 80, 355–362
30. **Costin B, O'Donnell SR, Wanstall JC.** A comparison of the selectivity of carazolol with that of other beta 2-selective adrenoceptor antagonists. *J Pharm Pharmacol.* 1983 Sep;35(9):590-2.
31. Cornelisse C.J. Bots .Th; Wintzen A.R; Ploem J.S y van der Broek; (1980). Real time morphometric analysis of type I and type II fibers in cryostat of human muscle biopsies. *Pathol.res. Pract*, 166,218-238.
32. Dransfield,E. andA. A. Sosnicki,1999. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *PoultrySci.* 78:743-746.
33. Dubowitz, V., Brooke, M.H.: *Muscle biopsy : A modern approach*. W.B. Saunders Co. Ltd. London. 1973; p: 5-73.
34. Dubowitz V. *Muscle Biopsy. A practical approach*.London, England.Bailliere Tindall,1985.
35. Dunshea, F. R., D'Souza, D. N., Pethick, D. W., Harper, G. S., & Warner, R. D. (2005). Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. *Meat Science*, 71, 8–38.
36. Edgerton V.R y Simpson D.R (1971): Dynamic and metabolic relationship in the rat extensor digitorum longus muscle . *Exp. Neurol.* 30,374-376.
37. Emery PW,Rothwell NJ, Stock MJ, Winter PD.(1984). Chronic effects ob beta 2 adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci Rep* 4:83-91,
38. Emorine, N. Blin and A.D. Strosberg , The human  $\beta$ 3-adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol. Sci.* 15 (1994), p. 3
39. Engel W.K.(1962). The essentiality of histo and cytochemical studies of neuromuscular diseases .*Neurology.*12, 778-790.
40. English A.W.y Letbetter W. D.(1982). A histochemical analysis of identified compartments of cat lateral gastrocnemius muscle .*Anat.Rec.*204, 123-130.
41. Essen-Gustavsson,B. and S. Fjelkner-Modig,1985. Skeletal muscle characteristicsin differentbreedsof pigsin relationto sensorypropertiesof meat. *MeatSci.* 13:33-47.
42. Fletcher DL. Broiler breast meat color variation, pH, and texture. *Poultry Sci.* 78 1999. P.1323.1327.
43. Fletcher DL. Poultry meat quality. *World's Poultry Sci J.* 58 2002.P. 131-145.

44. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ, MacLennan DH. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253 1991.P. 448-451.
45. Gauthier, G.F y Padykula, H.A.(1965). Cytochemical studies of adenosine triphosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum. *J.cell Biol.* 27,252-260.
46. Gauthier, G.F y Padykula, H.A.(1966). Cytochemical studies on fibre types in skeletal muscle. *J. cell. Biol.* 28. 333-354.
47. Gregory NG, Wilkins LJ. The effect of carazolol on the cardiovascular responses to adrenaline in stress sensitive pigs. *Vet Res Commun.* 1982 May;5(3):277-83
48. Goldspink, G. and S. Yang, 1999. *Poultry Meat Science: Poultry Science Symposium Volume 25*. R.I. Richardson and G.C. Mead, (Ed.), p. 3-18. CABI Publishing, Wallingford, UK.
49. Gordon, T., Perry, R., Srihari, T., Vrbova, G.: Differentiation of slow and fast muscles in chickens. *Cell Tiss. Res.*, 1977; 180: 211-222.
50. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, and Vesterby A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1988; 96(5):379-394.
51. Gunning, P., & Hardeman, E. (1991). Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *Faseb Journal*, 5, 3064–3070
52. Guth L, Samaha FJ ( 1970). Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* 28, 365-367.
53. Guth L, Samaha FJ (1969) Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp Neurol* 28:365-366
54. Guth, L. and F.J. Samara. 1969. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.* 25:139-152.
55. Henckel, P., Oksbjerg, N., Erlandsen, E., Barton-Gade, P., & Bejerholm, C. (1997).
56. Histo- and biochemical characteristics of the longissimus dorsi muscle in pigs and their relationships to performance and meat quality. *Meat Science*, 47,
57. Henckel, P., Andersson, M. & Holst, S. (1998). Influence of stunning method on pH-decrease and meat quality. In *Proceedings of the 44th International Congress on Meat Science and Technology* (pp. 1068-1069). 30 August -4 September, Barcelona, Spain.
58. Henckel, P. (2002). Genetic improvement in meat quality: Potentials and limitations. In *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. August 19-23, Montpellier, France.
59. Henckel, P., Karlsson, A., Oksbjerg, N., & Petersen, J.S. (2000). Control of post mortem pH decrease in pig muscles: experimental design and testing of animal models. *Meat Science*, 55(1), 131-138.
60. Hintz C.S; Coyl E.F; Kayser K.K; Chi M.H; y Lowry O.H 1984. Comparison of muscle fiber typing by quantitative enzyme assays and by myosin ATPase staining. *J. Histochem. Cytochem.* 32, 655-666.
61. H. (1982). Training induced morphological and functional changes in skeletal muscle. *Int.J.Sports. med.* 3,1-12.
62. Innis RB, Correa FM, Synder SH. Carazolol, an extremely potent beta-adrenergic blocker: binding to beta-receptors in brain membranes. *Life Sci.* 1979 Jun 11;24(24):2255-64
63. Kai M. (1984). Distribution of fiber types in equine middle gluteal muscle. *Bull. Equine.Res. Institute.* 21,46-50

64. **Kadir F, Zuidema J, Pijpers A, Melendez R, Vulto A, Verheijden JH.** Pharmacokinetics of intravenously, intramuscularly and intra-adiposely administered carazolol in pigs. **J Vet Pharmacol Ther.** 1990 Dec;13(4):350-5.
65. Khan M.A. Histochemical Sub-Types of Three Fibre-Types of Avian Skeletal Muscle. *Histochemistry* 50, 9- 16 (1976)
66. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. 2000.Scand J Med Sci Sports 10:332-337.
67. Kijowski, J., 1997. The issues of poultry meat and egg quality at the European symposia in Poznan. Pages 19–21 in: Proceedings of the 13th European Symposium on the Quality of Poultry Meat, Poznan, Poland.
68. Le Bihan-Duval, E., N. Millet, and H. Re´mignon, 1999. Broilermeat quality: effect of selection for increased carcass quality and estimates of genetic parameters. *Poultry Sci.* 78:822–826.
69. Le Bihan-Duval E, Debut M, Berri CM, Sellier, Santé-Lhoutellier V, Jégo Y; y Beaumont C Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. *BMC Genetics* 1998, 9:53 doi:10.1186/1471-2156-9-
70. Lefaucheur L, Ecolan P, Plantard L, Gueguen N (2002) New insights into muscle fiber types in the pig. *J Histochem Cytochem* 50:719- 730.
71. López Rivero J. Patrones morfométricos e histoquímicos de la población fibrilar del músculo glúteo medio del caballo en razas de diferentes aptitudes. Tesis de Doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba España. 1988.
72. López Rivero JL, Quiroz Rothe E. Diversidad Celular y naturaleza dinámica del músculo esquelético. En: Investigación. Decanato de la Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba (ed). 2001. I.S.B:N: 84-95609-09-6. pp339-50
73. Mabuchi K y Sréter F.A. (1982). Actomyosin ATPase. II Fiber typing by histochemical ATPase reaction. *Muscle and nerve*, 3 233-239.
74. Manual de procedimiento. The proven solution for image analysis. Media Cibernetics. 1999
75. Maxwell L.C. Faulkner J.A. y Lieberman D.A. ( 1973). Histochemical manifestations of age and endurance training in skeletal muscle fibers. *Am.J.Physiol.* 344,356-361.
76. Mahon, M., 1999. Poultry Meat Science: Poultry Science Symposium Volume 25. R.I. Richardson and G.C. Mead, (Ed.), p. 19-64. CABI Publishing, Wallingford, UK.
77. Mammoli R., R. Branciarri, D. Ranucci, D. Miraglia, A. Ciuffi, P. Avellini, and M. Severini. 2004. Giant fibers in broiler chickens. *Proc. 50th ICoMST, Helsinki*, 8-13 August 2004, 213-216.
78. Mc Conathy D. Giddings C.J. y Gonyea W.J. (1983). Structure function relationship of the flexor carpiradialis muscle compared among four species of mammals. *J. morph.* 175, 279-292.
79. Mersmann HJ. Overview of the effects of beta adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J Anim Sci* 76:160-172, 1998
80. **Mejean A, Guillaume JL, Strosberg AD.** Carazolol: a potent, selective beta 3-adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1995 Nov 30;291(3):359-66
81. McCurdy, M. C., S. Barbut, and M. Quinton, 1996. Seasonal effects on PSE in young turkey breast meat. *Food Res. Int.* 29:363–366.
82. McKee, S. R. and A. R. Sams. 1997. The effect of seasonal heat stress on rigor development and the incidence of pale, exudative turkey meat. *Poultry Sci.* 76:1616-1620.
83. McKee S. Muscle fiber types in broilers and their relationship to meat quality. Department of poultry Science, Auburn University.
84. Mignot J; Barres D; y Durigon M. Méthodes histomorphométriques . I. Méthodes semiautomatiques application des tables a digitiser. *Acta Pathol.* 2, 152-155.

85. Moloney AP, Allen P, Ross DB, Olson G, Convey EM. Growth, feed efficiency and carcass composition of finishing Friesian steers fed the beta adrenergic agonist L-644,969. *J Anim Sci* 68:1269-77, 1990.
86. Montes GS. (1996). Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International* 20, 15-27.
87. Moore M.J; Rebeiz JJ; y Holden M: (1971). Biometric analyses of normal skeletal muscle. *Acta Neuropathol.* 19, 51-69.
88. Ouali, A. (1990). Meat tenderization: Possible causes and mechanisms. A review. *Journal of Muscle Foods*, 1, 129–165.
89. Ovalle, W.K.: Histochemical dichotomy of extrafusal and intrafusal fibers in an avian slow muscle. *Am. J. Anat.*, 1978; 152: 587- 598.
90. Padykula, H.A., and E. Herman. 1955. Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphates as measured by histochemical techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 29:89-90.
91. Pearson, A.M. and R.B. Young, 1989. Pages 248-260 in: *Muscle and Meat Biochemistry*. Academic Press, Inc., San Diego, CA Peter J.B y cols. Metabolic profiles of three fibres types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry* 11, 2627-2633
92. Pette D. (1985). Metabolic heterogeneity of muscle fibers. *J. Exp. Biol.* 115, 179-189.
93. Pette D, Spamer C (1986) Metabolic properties of muscle fibres. *Fed Proc* 45:2910-2914
94. Pette D, Staron S (1990) Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibres. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 116:1-76
95. Pette D, Peuker H, Staron RS. The impact of biochemical methods for single muscle fiber analysis. *Acta Physiol Scand.* 1999. Aug 166 (4) 261-77.
96. Pette D. *Plasticity of the muscle*. Walter de Gruyter and Co. Berlin. 1980.
97. **Pietri-Rouxel F, Strosberg AD.** Pharmacological characteristics and species-related variations of beta 3-adrenergic receptors. *Fundam Clin Pharmacol.* 1995;9(3):211-8
98. Quiroz Rothe, 2003. bases celulares y moleculares de la respuesta muscular del caballo frente al entrenamiento y a miopatías primarias y neurogenicas. Tesis de Doctorado. ISBN. 84-688-2599-9. Copyright 2003.
99. Quiroz Rothe E, López Rivero J.L. (2001) Co-ordinated expression of contractile and non-contractile features of control equine muscle fibre types characterised by immunostaining of myosin heavy chains. *Histochem Cell Biol* Oct;116(4):299-312.
100. Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR Muscle fiber types and function. 1993. *Curr Opin Rheumatol* 5:695-705
101. Rasmussen B.B.; Wolfe R.R. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle, *Annu. Rev. Nutr.* 19 (1999), pp. 463–484
102. Reggianni C; Mascarello F. Fibre type identification and functional characterization in adult livestock animals. In: *Muscle development of livestock animals. Physiology, genetics and meat quality.* Edit. MFW.te Pas M E. Everts & H P Haagsman. CABI Publishing. 2004 .pp 39-63.
103. Rehfeldt, C., Fiedler, I., & Stickland, N. (2004). Number and size of muscle fibres in relation to meat production. In M. F. W. te Pas, M. E.
104. Everts, & H. P. Haagsman (Eds.), *Muscle development of livestock animals* (pp. 1–38). Wallingford, UK: CAB International.
105. Rehfeldt, C I. Fiedler, G. Dietl, K. Ender. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livestock Production Science* 66 (2000) 177–188

106. Reichmann H; Pette D.(1982). A comparative microphotometric study of succinate deshydrogenase activity levels in type I,IIA and IIB fibers of mammalian and human muscle. *Histochem.* 74,27-41.
107. Rivero, J. L. L., Serrano, A. L., Barrey, E., Valette, J. P., & Jouglin, M. (1999). Analysis of myosin heavy chains at the protein level in horse skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 20, 211–221.
108. Rivero JLL, Talmadge RJ, Edgerton VR (1997) A sensitive electrophoretic method for the quantification of myosin heavy chain isoforms in horse skeletal muscle: histochemical and immunohistochemical verifications. *Electrophoresis* 18:1967- 1972
109. Sauver, B. 1997. Les critères et facteurs de la qualité des poulets Label Rouge. *Prod. Anim.* 10:219-226.
110. W. Scott, J. Stevens and S.A. Binder-Macleod, Human skeletal muscle fiber type classifications, *Phys. Ther.* 81 (2001), pp. 1810–1816
111. Sandstedt PE R. (1981). Representativeness of a muscle biopsy specimen for the whole muscle. *Acta. Neurol. Scand.* 64, 427-437.
112. Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M Tenderness classification of beef: II. Design and analysis of a system to measure beef longissimus shear force under commercial processing conditions. *J Anim Sci.* 1999 Jun;77(6):1474-81.
113. Seligman A.M; Rutenburg A.M (1951). The histochemical demonstration of succinic deshydrogenase. *Science*, 113, 317-321.
114. Shear, C.R., Goldspink, G.: Structural and physiological changes associated with the growth of avian fast and slow muscle. *J. Morphol.*, 1971; 135: 351-372.
115. Schiaffino S, Reggiani C Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. 1996.*Physiol Rev* 76:371-373.
116. Shubber A.H. (1972). On the succinic deshydrogenase activity in equine skeletal muscle fibers. *Acta :morph. Neerl-scand.*9, 229-234.
117. SpamerC; Pette D. (1980 ). Metabolic subpopulation of rabbit skeletal muscle fibers. In *plasticity of muscle.* D. Pette (ed). Walter de Gruyter and Co.Berlin, New York.pp 19-30.
118. Staun H.(1972). The genetic influence on number and size of muscle fibers. *W.Rev.Anim.Prod.* 8, 18-26.
119. Stephan E. Untersuchungen zum Wachstum beim Huhn unter besonderer Berücksichtigung der Calcium-Regulation und des Energiestoffwechsels myokardialer Mitochondrien sowie histometrischer Parameter. *Dissertation. Univ. Giessen*, 1993.
120. Stein J.M. y Padykula H.A.(1962). Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Am.J.Anat.*110, 103-115.
121. Sievers D. The influence of the new beta sympatholytic agent carazolol on sympatheticotonic false regulation *Med Klin.* 1977 Jul 15;72(28-29):1209-11
122. Song S.K; Shimada N y Anderson P.J ( 1963). Orthogonal diameter in the analysis of muscle fibre size and form. *Nature*, 200, 1220.
123. Sosnicki, A.A. and B.W. Wilson, 1991. Pathology of turkey skeletal muscle: implications for the poultry industry. *Food Structure* 10:317-326.
124. Sumano H, Ocampo L, Gutiérrez L. Clenbuterol y otros beta agonistas ¿ Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? *Vet Méx* 33:137-159,2002
125. Smulders, F. J. M., B. B. Marsh, D. R. Swartz, R. L. Russell and M. E. Hoenecke, 1990. Beef tenderness and sarcomere length. *Meat Sci.* 28:349-363.

126. Sturkie, P.D., 1986. Pages 77-78 in: Avian Physiology, 4th edition. Springer- Verlag New York, Inc., New York, NY.
127. Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR Muscle fiber types and function. 1993. *Curr Opin Rheumatol* 5:695-705.
128. Taylor C R E, Weibel and L Bolis (eds). Design and performance of muscular systems. 1985. *J. Exp. Biol.*, Vol 115. Cambridge . The Company of Biologists,Ltd
129. Totland, G. K., H. Kryvi and E. Slinde, 1988. Composition of muscle fibre types and connective tissue in bovine M. semitendinosus and its relation to tenderness. *Meat Sci.* 23:303-315.
130. Tunnel G,L ; Hart H,W, Simultaneous determination of skeletal muscle fiber, types I, IIA, and IIB by histochemistry. *Arch. Neurol.*34.171-173
131. Userpater J, FerderMD, Inserta P, Stella I Y, Ferder LF, Inserta F. Aplicación del análisis de imágenes computarizado en la histopatología renal. *Rev. Nefrol. Diál. y Transpl.*, Volumen 23 - N° 4 - Diciembre 2003, Pág. 139-144
132. Van Leeuwen FXR. CARAZOLOL. Toxicology Advisory Centre National Institute of Public Health. www. IPC Inchemand Environmental Protection,Bilthoven, Netherlands
133. Venema y Overweg H.W. y Overweg J. Análisis of the size and shape of cross sections of muscle fibres.*Med. Biol. Eng.* 681-692.
134. Weibel ER. Stereological methods I: practical methods for biological morphometry. London, UK: Academic Press, 1989; 9-62.
135. Wells WA, Rainer RO, Memoli VA. Equipment, standardization, and application of image processing. *Am. J. Clin. Pathol.* 99:4856. 1993