

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



APLICACION DE CHOQUE ELECTRO-OSMOTICO EN
UNA SOLUCION ELECTROLITICA PARA LA OBTENCION
DE ESQUELETOS COMPLETOS.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
P.M.V.Z. HECTOR RODRIGUEZ ACOSTA

DIRECTOR DE TESIS:
M.V.Z. JACINTO BAÑUELOS PINEDA
GUADALAJARA, JAL., ENERO DE 1992.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por todo, lo que mis palabras no pueden explicar. GRACIAS.

A mi Asesor de Tesis:

M.V.Z. JACINTO BAÑUELOS PINEDA. Por su participación, Orientación y ayuda en la realización del presente trabajo.

A mis Maestros: Por compartir sus conocimientos y haberme encaminado en mi realización.

DEDICATORIA:

Con gran admiración, respeto y orgullo a los seres que más quiero y que me han dado la vida: A ellos que me guiaron con su comprensión, apoyo y buen ejemplo a lograr las grandes metas que hay en la vida: MIS PADRES.

ROBERTO RODRIGUEZ CHACON
APOLINARIA ACOSTA DE RODRIGUEZ

Por su apoyo y comprensión invaluable y amor a:MI ESPOSA

LUZ ESTELA GUERRERO DE RODRIGUEZ.

A la ilusión que motiva en mí con mucho cariño a :MI HIJA

LUZ STEPHANY RODRIGUEZ GUERRERO.

A todos mis HERMANOS les dedico un esfuerzo que es posible siempre que uno se lo propone.

A tí amigo que me alentaste en todo momento durante el desarrollo de -
mi tesis.

EL PRESENTE TRABAJO FUE ELABORADO EN EL DEPARTAMENTO
DE INVESTIGACION CIENTIFICA Y METODOLOGIA DE LA FA -
CULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNI
VERSIDAD DE GUADALAJARA.

CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCION	
	a) Antecedentes.....	2
	b) Fundamentos teóricos.....	4
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
IV.	JUSTIFICACION.....	8
V.	HIPOTESIS.....	9
VI.	OBJETIVOS.....	10
VII.	MATERIAL Y METODOS.....	11
VIII.	RESULTADOS.....	15
IX.	DISCUSION.....	18
X.	CONCLUSIONES.....	23
XI.	BIBLIOGRAFIA.....	24

I. RESUMEN.

Con el propósito de desarrollar un procedimiento sencillo para obtener esqueletos completos de mamíferos se realizaron estudios en ratas utilizando corriente eléctrica y una solución hiperosmótica conteniendo fijador y electrolito. Se analizó el efecto de la inclusión de pulverizado de papaya y diferentes rangos de temperatura sobre el aspecto final del material tratado, así como la influencia de ácido acético e hipoclorito para conferir propiedades deseables a los huesos. Se obtuvieron esqueletos completos desprovistos de tejidos blandos sin ningún daño bajo determinadas condiciones identificadas. El procedimiento ensayado tiene una aplicación importante en la docencia.

II. INTRODUCCION.

a) ANTECEDENTES.

El estudio de la Osteología tiene importantes aplicaciones clínicas en Medicina Veterinaria y para algunas especies en particular, por ejemplo en equinos representa una especialidad de gran desarrollo por las consecuencias que reviste la integridad esquelética para la actividad del animal, asimismo en pequeñas especies el tratamiento quirúrgico de lesiones óseas es especialmente importante (1).

Por otra parte, el estudio patológico óseo permite la identificación de enfermedades que alteran el equilibrio sistémico mineral, la actividad hematopoyética en médula ósea, o como origen de tumores y otros estudios más especializados (2). En ocasiones es necesario practicar disección de las inserciones articulares intactas junto con la disección fina de la columna vertebral y pelvis en los casos donde por otros medios no puede demostrarse un trastorno estructural que explique la ocurrencia de parálisis o paresias, sobre todo en perros y gatos (3).

Actualmente se dispone en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de un museo en que están presentes esqueletos de las principales especies domésticas, mismo que ha resultado bastante instructivo para alumnos, por lo que en el presente estudio se tiene la intención de sistematizar una innovación técnica que permita la recuperación de esqueletos

completos de cordados en forma sencilla y práctica y que el material resulte de calidad para facilitar su estudio, a fin de que pueda aumentarse el número de especies presentes, además de preparar esqueletos suficientes para apoyar los departamentos o secciones de Anatomía de otras Facultades y Escuelas técnicas agropecuarias donde se curse la especialidad de Zootécnia.

Lo anterior surgió por el conocimiento de las limitaciones que presenta el actual método de descarnado para la obtención de esqueletos, mismo que resulta bastante prolongado y laborioso, sobre todo cuando se someten a tratamiento cuerpos que conservan sus partes blandas, aparte de que los huesos provenientes de estos cadáveres conservan una cantidad importante de lípidos una vez concluido el tratamiento con álcalis.

b) FUNDAMENTOS TEORICOS.

El fundamento del procedimiento, motivo del presente trabajo se basa en el conocimiento de la capacidad electro-conductiva que adquieren los tejidos animales cuando se ponen en contacto con un electrolito, asi como en la desnaturalización de la estructura proteínica cuaternaria de algunos elementos estructurales corporales con alta resistencia a la tracción, como los sitios de inserción músculo-esquelética bajo condiciones de temperatura superior a 60o C (4).

Asimismo, está descrito que los fijadores químicos poseen una diferente velocidad de penetración a los tejidos, y al entrar en contacto con estos inducen a la formación de heteropolímeros cuya estabilidad es mucho mayor que la del tejido mismo, sin embargo, algunas estructuras compuestas fundamentalmente por tejido fibro-conectivo denso oponen una mayor resistencia a la penetración del fijador, por lo que son más lábiles que aquellos en los que los agentes fijadores penetran más rápidamente (5).

Bajo condiciones de aumento en la temperatura se acelera la velocidad de penetración de las soluciones fijadoras, la desventaja es que también se acelera la autólisis de los tejidos al provocarse inestabilidad de las membranas lisosomales con la liberación de enzimas proteolíticas que inician la digestion de los elementos presentes en la matriz

citoplásmica, por el contrario la temperatura elevada produce coagulación coloidal de solutos intracelulares e intercelulares que impide la descomposición y preserva el arreglo citoarquitectónico. Después de la autólisis química se produce putrefacción al ocurrir crecimiento de microorganismos. Por lo anteriormente señalado resulta vital el uso de compuestos químicos que impidan la putrefacción al modificar en forma importante el pH del tejido y la composición del fluido intersticial (6) que por su contenido de nutrientes resulta un medio propicio para el crecimiento de microorganismos, lo anterior puede acelerarse por la acción de soluciones hiperosmóticas ($>2,000$ mosm/l) que inducen una crenación celular con un efecto de extracción de fluidos que resulta en una retracción de los tejidos (5).

Debido a la diferente composición de los tejidos resulta predecible una distinta respuesta cuando son sometidos a factores destructivos como la excitación que se origina cuando la frecuencia del paso de una corriente eléctrica, que se manifiestan en vibración de la masa y la desnaturalización de colágena y desorganización de elementos fibrilares responsables de conferir resistencia al tejido fibro-conectivo (7).

En estudios experimentales se ha demostrado la capacidad de ensamblaje y desorganización de subunidades diméricas del citoesqueleto celular por efecto sobre todo de la temperatura y otros elementos que regulan la fuerza iónica (8,9).

Por lo anteriormente señalado resulta factible considerar la posibilidad de inducir preferentemente la desnaturalización de las inserciones músculo-esqueléticas para separar la masa blanda de los tejidos, aparte de propiciar el desarrollo de autólisis química sin proliferación bacteriana, lo que permitiría regular la severidad del efecto destructivo combinado, vibración de alta frecuencia, choque osmótico para disgregar completamente las uniones entre los huesos o solamente provocar la separación de la masas blandas conservando unidos los huesos entre sí, lo cual podrá resultar instructivo para estudiantes de Anatomía comparada de los cordados.

Para el estudio anteriormente comentado se ha seleccionado a la rata por razones económicas, para conferir mayor reproducibilidad del tratamiento, asimismo se analizará una variable adicional cuyo fundamento se basa en las propiedades de colagenasa que posee la bromelina y la papaina (enzimas proteolíticas vegetales) con la intención de acelerar el proceso.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los estudios osteológicos en Medicina Veterinaria implican la obtención de unidades o esqueletos óseos completos de diferentes especies, por lo que es deseable que las técnicas de descarnado proporcionen estos elementos óseos de calidad aceptable (conservación de la estructura completa y sin grasa) en forma sencilla. Es por ello que se propone mediante la asociación de energía eléctrica, elevada osmolaridad y temperatura es posible afectar la integridad de las inserciones músculo-esqueléticas, para obtener esqueletos con diferentes grados de organización respecto a sus uniones inter-óseas sin el uso de ácidos fuertes que generen vapores tóxicos o resulten corrosivos para los tejidos (3), por lo que pueden prepararse esqueletos completos en forma sencilla para utilizarlos en diagnósticos de patologías óseas, elaboración de museos de osteología y de la docencia de Medicina Veterinaria bajo condiciones sanitarias admisibles.

IV. JUSTIFICACION

Para obtener el esqueleto de un cuerpo completo es necesario separar manualmente las partes blandas para exponer los elementos óseos. Estos posteriormente se someten a cocción en una solución alcalina y se limpian para exponerlos al sol que ejerce un efecto bactericida por los rayos ultravioleta, de lo que resulta un efecto de blanqueado y se aumenta la fluidez de las grasas que forman parte de la medula ósea que escurre por los poros (técnica comúnmente utilizada en esqueletos humanos). El escurrimiento de grasas persiste por tiempo prolongado, lo que dificulta el manejo adecuado de los huesos. Por otra parte, cuando se recuperan esqueletos que fueron enterrados por lo menos durante cinco años, las piezas pequeñas ya han sufrido un proceso degradativo que se incrementa por los tratamientos convencionales. En medicina veterinaria el manejo es algo similar, solo con la variante de que los huesos no son expuestos a los rayos del sol sino que son sometidos a secado en la sombra. Existiendo la técnica de obtención de huesos (craneos de neonatos) en la que se someten a una solución de agua y detergente, introduciendo semillas (maiz, garbanzo, frijol, etc.) en orificios del craneo y poniendo al fuego se logra la separación y descarnado de los huesos del craneo con aceptable resultado de descarnado y desengrasado. (12) Por lo que se propone un método alternativo con mayores ventajas que los tradicionales

V. HIPOTESIS.

La alta osmolaridad y temperatura, fricción molecular tisular y acidez del medio desnaturalizan el tejido fibro-conectivo denso de inserciones músculo-esqueléticas, lo que permite obtener esqueletos completos.

VI. OBJETIVO GENERAL.

Preparar esqueletos completos de cordados mediante una técnica electro-osmótica.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1 Establecer la temperatura y duración de la exposición más adecuadas.
- 2 Determinar la influencia proteolítica de la enzima papaína sobre la separación de la masa blanda del esqueleto.
- 3 Valorar los efectos del tratamiento adicional para solubilización de grasas y cambio de coloración de los huesos.

VII. MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 20 ratas Swiss-Wistar adultas de ambos sexos con peso de 230 a 240 gr. Asi como dos soluciones experimentales, una de las cuales con pH 4.2, estuvo compuesta por: acido acético al 7%, formaldehído 3%, sacarosa 15% (peso/volumen), azida de sodio 0.01% y cloruro de sodio al 1% mezclados y diluidos en la cantidad suficiente de agua desionizada para completar 10 litros (solución 1). La segunda solución contenía las mismas sustancias, solo se adicionaron 50 gr de un pulverizado obtenido a partir de la cáscara y semillas de papaya (Solución 2). Todos los experimentos se realizaron manteniendo una relación 2:1 volumen de la sol./masa orgánica (2 l de solución para cada rata), por lo que se procesaron juntos 5 animales, solo que cada uno de estos se envolvió en una malla de plástico inerte para evitar la dispersión de los miembros y se utilizaron sustancias de grado industrial. El tratamiento electro-osmótico se realizó en una caja de fibra de vidrio de forma rectangular de 12 l de capacidad.

En la cámara se instalaron cuatro electrodos fijos de carbon inorgánico conectados en forma contralateral según descripción de Macias C. (1990) para hacer pasar a través de estos corriente eléctrica alterna de 120 voltios hasta alcanzar una temperatura máxima de 95 °C para un grupo experimental y de 70°C para otro. A partir de 22°C de la solución (temperatura ambiente), para lo cual se obtuvo registro de la temperatura cada 15 min mediante un termómetro de mercurio con

escala de 0-150°C instalado a través de la tapa. La misma solución se reutilizó en dos ocasiones. La cámara se cerró con una tapa de acrílico para evitar la pérdida de volumen por la evaporación de las soluciones. La mitad de los animales fueron sacrificados mediante sobredosis anestésica con cloroformo para luego iniciar el tratamiento experimental en la cámara. La distribución de los cinco grupos experimentales de cinco animales cada uno fué de la siguiente forma:

PRIMER GRUPO.

Tratamiento para descarnado con la solución I durante 29 horas (hr) con ciclos intermitentes de ascenso y descenso de la temperatura hasta un máximo de 95 C Desengrasado, blanqueo 24 hrs 75 C.

SEGUNDO GRUPO.

Tratamiento con ciclos intermitentes/26 hrs hasta 70 C en solución I. Desengrasado y blanqueo 26 hrs 75 C.

TERCER GRUPO.

Trece hrs continuas hasta 95 C en solución II. Segundo tratamiento 12 hrs 75 C.

CUARTO GRUPO.

Doce hrs continuas hasta 70 C en solución II. Segundo tratamiento por 8 hrs a 50 C.

Al finalizar la exposición en la cámara se recuperaron los huesos para ser evaluados y después se separaron los huesos largos, escápula, maxilar inferior y vertebras cervicales como muestras representativas de cada animal que se pesaron en conjunto después de secarse a temperatura ambiente por 8 hr. Inseguida se realizó una exposición adicional electroquímica en 10 l de la solución III que contenía ácido acético al 3% e hipoclorito al 5% en agua contenidos en la misma caja de fibra de vidrio a temperatura de 75 °C durante 26 hr para registrar nuevamente el peso del material desengrasado, según los resultados obtenidos al finalizar esta etapa el tiempo de tratamiento se redujo hasta 8 hr y temperatura de 50 C. Al finalizar el proceso completo se analizó el aspecto, consistencia y olor de los huesos una vez desecados a temperatura ambiente y a la sombra por 8 hr.

ANEXO DE MATERIALES Y METODOS

Solución I

Acido Acético.....	7%
Formaldehído.....	3%
Sacarosa.....	15%
Azida de Sodio.....	0.01%
Cloruro de Sodio.....	0.1%
Agua.....	74.89%
Total.....	100.00%

Solución II

Acido Acético.....	7%
Formaldehído.....	3%
Sacarosa.....	15%
Azida de Sodio.....	0.01%
Cloruro de Sodio.....	0.1%
Pulverizado de papaya.....	0.5%
Agua.....	74.39%
Total.....	100.00%

Solución III

Acido Acético.....	3%
Hipoclorito.....	5%
Agua.....	92%
Total.....	100%

VIII. RESULTADOS.

PRIMER GRUPO EXPERIMENTAL.

Al inicio del procedimiento la temperatura promedio fué de 22 C y se incrementó rápidamente hasta 80 C después de 5 horas, al término de las cuales se desconectó el equipo y al día siguiente se repitió el tratamiento, de lo que resultó un total de 29 horas de exposición a la corriente eléctrica hasta alcanzar una temperatura máxima de 95 C. (Graf.1). En los momentos en que la temperatura se encontraba más elevada se produjo la emisión de vapores irritantes que hicieron necesario el uso de mascarilla para gases y lentes protectores.

Como resultado del tratamiento descrito se produjo separación de las partes blandas del esqueleto con gran facilidad y se observó una pigmentación oscura en los huesos como resultado de la caramelización de la sacarosa. Los restos de tejidos adheridos a los huesos se desprendieron durante el lavado con agua corriente. Las muestras óseas fueron secadas durante 8 horas a la sombra y a temperatura ambiente para registrar el peso antes de continuar con el tratamiento para el desengrasado y blanqueo de las piezas (Solución 3).

Después de una exposición por 24 horas se alcanzó una temperatura máxima de 75 C, los huesos se lavaron brevemente por segunda ocasión para eliminar completamente la solución desengrasante y blanqueadora y luego se secaron y pesaron. Los huesos mostraron un aspecto desengrasado y aparecieron de color blanquecino. Sobre todo en los huesos planos se observó un ligero ataque corrosivo que perforó el hueso atribuible a la elevada temperatura que incrementa la fragilidad ósea.

SEGUNDO GRUPO EXPERIMENTAL

Las ratas se manejaron de la misma forma que en el grupo anteriormente descrito, solo que la exposición fué por 26 hr hasta alcanzar una temperatura máxima de 95 C (Graf.1). Los huesos obtenidos tuvieron una apariencia muy semejante a la descrita solo que a diferencia de los craneos completos recuperados del primer grupo, con este tratamiento se separaron los huesos de las comisuras, por lo que se liberó el encéfalo y parte del tallo cerebral y médula espinal. Esta separación fué debida a la menor edad de las ratas sin relación alguna con el procedimiento.

El proceso de desengrasado y blanqueado se realizó por 26 horas hasta una temperatura máxima de 75 C y al secar los huesos se registraron diferencias en su peso inicial de alrededor de 0.3 g, mismas que no fueron significativas cuando se compararon con las mismas muestras antes del proceso de desengrasado. También se produjo ataque corrosivo a la estructura ósea superficial semejante a la observada.

TERCER GRUPO EXPERIMENTAL.

Para este grupo se utilizó la solución 2 que a diferencia de la primera solución contenía pulverizado de papaya (efecto de colagenasa). La duración del tratamiento fué de solamente 13 horas y temperatura máxima de 95 C (Graf.2) ininterrumpidos. Como resultado de lo anterior la separación de los tejidos blandos fué igualmente fácil que con las otras soluciones, solo que no se produjo la misma pigmentación debido al menor tiempo de exposición.

En el material desecado después del desengrasado y blanqueado simultáneos en la misma solución 3 por 12 horas los resultados fueron sobresalientes respecto a los anteriormente obtenidos.

CUARTO GRUPO EXPERIMENTAL.

El procedimiento fué idéntico al anterior (Graf.2), solo que el tiempo de tratamiento para separar tejidos blandos fué de 12 horas con los mismos resultados. El tratamiento de desengrasado y blanqueado fué de 8 horas sin que hubiera diferencias importantes respecto al aspecto del material que se obtuvo con 12 horas.

Al parecer el principio del procedimiento desarrollado se basa en el hinchamiento inicial que sufre la colágena presente en el tejido fibroconectivo denso de los sitios de inserción músculo-esquelética seguida de la subsecuente desnaturalización electro/térmica de las estructuras cuaternarias proteicas (4) que conduce a la separación de las masas blandas sin que los tejidos óseos sufran algún tipo de daño como regularmente sucede por el uso de ácidos fuertes o cuando se someten a cocción restos óseos humanos en "cal viva" obtenidos de cementerios, este mismo tratamiento aplicado a esqueletos recientes de animales no es capaz de separar completamente el tejido fibroconectivo, lo que debe hacerse manualmente y resulta bastante laborioso (5) .

Las piezas que se obtienen, a diferencia de los métodos tradicionales resultan completamente desengrasadas, estériles, inodoras y de color blanquecino. La presencia de aldehídos en la mezcla evita la putrefacción de los tejidos o detiene la autólisis en los casos de haber transcurrido bastante tiempo post-mortem, por lo que no se generan malos olores, la mezcla reutilizada que se descarta no resulta contaminante ni contiene compuestos reactivos.

Durante el tratamiento de tejidos frescos o fijados se destruye la población bacteriana presente debido a la elevada osmolaridad de la solución, la presencia de azida de sodio (inhibidor) y el bombardeo de electrones que causan inestabilidad de las paredes bacterianas (5). Cuando se someten a tratamiento cadáveres sin fijar se produce una aceleración de la ruptura de membranas lisosomales con

liberación de enzimas líticas que conducen a autólisis sin putrefacción a pesar de la presencia de formaldehído en la mezcla ensayada (7). En los tejidos fijados no sucedería lo mismo, sin embargo con base en las experiencias obtenidas del tratamiento de cadáveres fijados por perfusión intracardiaca que indujo la formación de entrecruzamientos heteropoliméricos entre los radicales libres de aldehídos y los tejidos (11) se comprobó que se logra el mismo efecto de separación de tejidos blandos, solo que el olor irritante que se genera es menos imperceptible.

El tratamiento descrito puede aplicarse a cualquier especie de cordados con los ajustes necesarios respecto a la potencia del proceso desnaturalizante, lo cual es motivo de investigación constante a fin de establecer las condiciones específicas en relación con el tipo de esqueleto (óseo o cartilaginosa) y la relación masa/volumen.

Por lo anterior, es posible obtener esqueletos de diferentes clases de animales domésticos con fines didácticos, aparte de la formación de un museo destinado a la enseñanza. Asimismo resultaría interesante conservar esqueletos que hayan sufrido patologías óseas de origen diverso. Así podemos sugerir como la especie susceptible a estudio a el perro por su versatilidad referida a fines didácticos como por su fácil manejo de las piezas, ajustando sistemáticamente las variantes de masa-volumen-temperatura interrecurrentes al proceso.

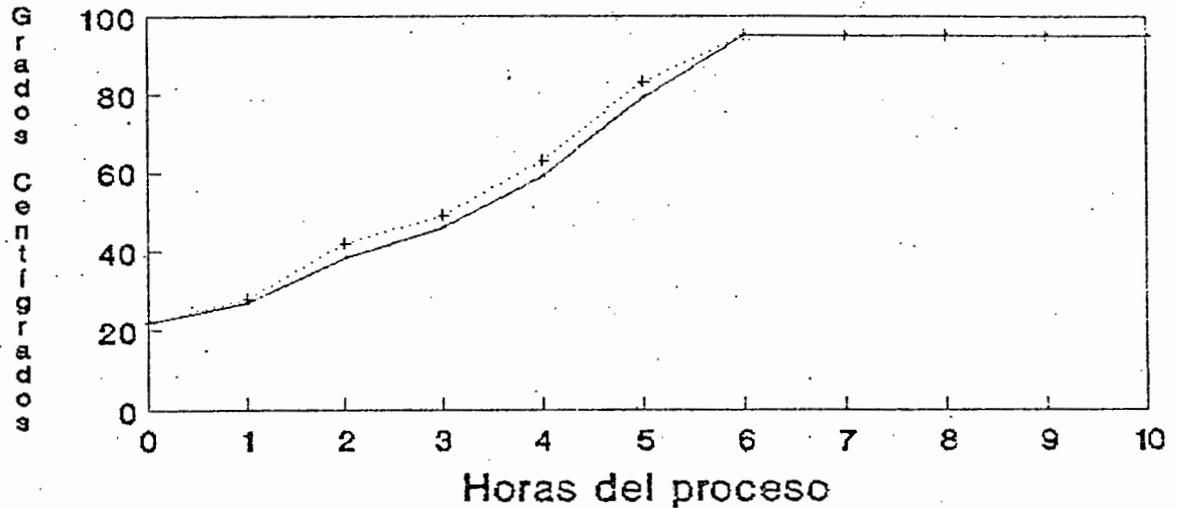
Para realizar esta técnica se requiere de corriente

eléctrica alterna y dos cámaras, una destinada a practicar el proceso desnaturalizante y la segunda para el tratamiento desengrasante y de blanqueado simultáneos con el uso combinado de ácido acético e hipoclorito. Es necesario evitar que la temperatura rebase los 70°C en las soluciones para evitar la evaporación y la emisión de grandes cantidades de vapores, aparte de la caramelización de la sacarosa que reduce las propiedades de la solución y la pigmentación de los huesos, sin embargo sería recomendable el realizar el proceso en un lugar ventilado y utilizando una mascarilla con filtro para gases y lentes de protección, aparte de tener cuidado en el manejo de los electrodos debido a que cuando la temperatura es alta se genera un elevado amperaje capaz de causar un choque eléctrico de consecuencias impredecibles.

La técnica ensayada permitió lograr los resultados previstos, particularmente la presencia de pulverizado de papaya aceleró el efecto colagenasa de los tejidos y redujo en un 50% el tiempo inicial, por lo que se recomienda utilizarla.

Gráfica 1

Proceso electroquímico.

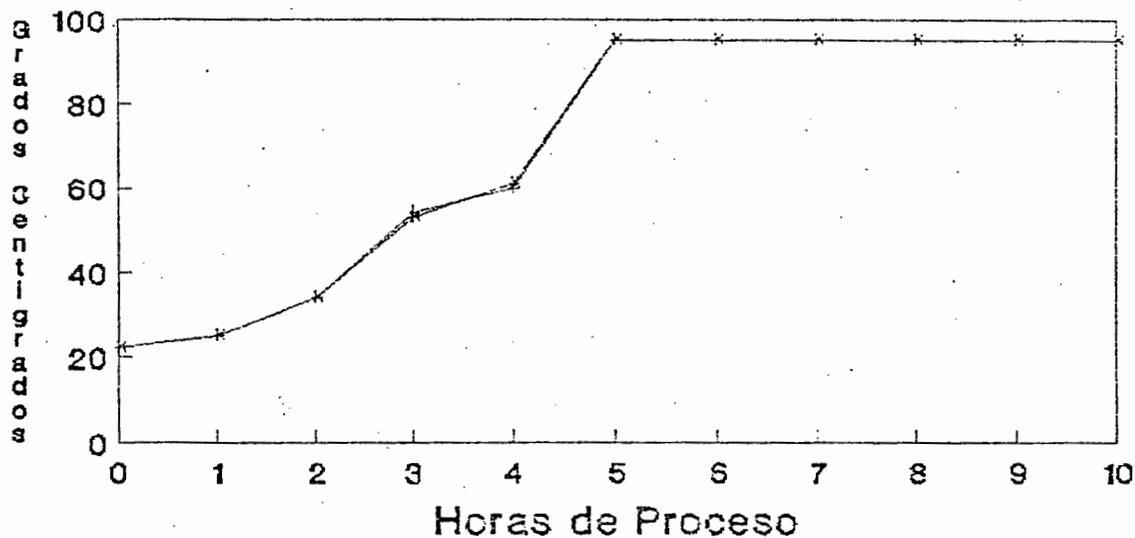


— Experimento 1 + Experimento 2

Muestra el ascenso de la temperatura durante el primer y segundo experimento la cual se comportó casi igual.

Gráfica 2

Temperaturas con pulverizado



— Experimento 3 — Experimento 4

A las 5 hrs de iniciado el proceso electroquímico en los experimentos 3 y 4 fue alcanzada la máxima temp.

X. CONCLUSIONES

1 EL USO DE CORRIENTE ELECTRICA Y ACIDOS ORGANICOS PERMITIO LA OBTENCION DE ESQUELETOS COMPLETOS DESPROVISTOS DE OTROS TEJIDOS.

2 EL MATERIAL RESULTANTE FUE BLANQUECINO, CON BAJO CONTENIDO DE GRASA E INODORO.

3 LA UTILIZACION DE PULVERIZADO DE SEMILLAS Y CASCARA DE PAPAYA ACELERO CONSIDERABLEMENTE EL PROCEDIMIENTO.

4 SE IDENTIFICARON LAS VARIABLES INTERCURRENTES DEL PROCESO, POR LO QUE ES POSIBLE ADAPTARLO PARA DIFERENTES SITUACIONES.

XI. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Vorontsov, N.N. 1989. On the methodology of morphology and levels of morphologic analysis. *Obshch Biol.* 1989. Nov-Dec. 50(6). P 737-45.
- 2.- Horne, P.D., Mackay, A., Jahn, A.F., Hawke, M. Histologic processing and examination of a 4,000-year-old human temporal bone. *Arch Otolaryngol.* 1976. Dec. 102(12). P 713-5.
- 3.- Ninomiya, H., Nakamura T., Niizuma, I., Tsuchiya, T. Penile vascular system of the dog. An injection-corrosion and histological study. *Nippon Juigaku Zasshi.* 1989 Aug. 51(4). P 765-73.
- 4.- Klaus, Troeger y Wolfgang Woltersdorf. Influencia del escaldado y el depilado en la faena de cerdos sobre la calidad de la carne. *Fleischwirtsch, español* 1/1987. p. 10-16.
- 5.- Linch M.J., Raphael S.S., Mellor L.D., Spare P.D. e Inwood M.J.H.. 1987. *Técnicas Histológicas. Métodos de laboratorio. Segunda Edición. Nueva Editorial Interamericana.* p. 1099-1114.
- 6.- F. Wirth : 1978. El pH y la elaboración de productos.

cárnicos. 5to seminario de capacitación en kulmbach 1978.
p.24-27.

- 7.- Barragan R.D., Reyes V.W.P., Mora G.J. y Garcia E.J..
1988. Utilización de algunos subproductos agroindustriales
y pesqueros mediante ensilaje para la alimentación animal.
Ciencia Animal. Abril-Junio (3):2-8.
- 8.- Stevens, E.D., Godt, R.E. 1990. Effects of temperature
and concomitant change in pH on muscle. Am J Physiol.
1990 Aug. 259 (2 Pt2). P R204-9.
- 9.- Mueller, R.F., Taylor, G.R. Stewart, A.D., Noble, J.S.,
Quirke, P., Batcup, G., Ivinson, A. 1990. Polymerase
chain reaction (PCR) on fixed necropsy material
(letter). J. Med. Genet. 1990 Jan. 27 (1). P 67-8.
- 10.- Sterchi, D.L., Eurell, J.A. 1989. A new method for
preparation of undecalcified bone sections. Stain
Technol. 1989 Jul. 64(4). P 201-6.
- 11.- Guillen Mojica J.. 1991. Preparacion de cadaveres de
canidos completos mediante fijacion electroquimica
experimental. Tesis de licenciatura. Fac. de Medicina
Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Guadalajara.

- 12.- Salas Vazquez M., 1989. Técnicas de preparación de piezas anatómicas y conservación de cadáveres completos. Tesis de licenciatura Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U. De G.