

EFECTO DEL ENTRENAMIENTO SOBRE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS Y COMPOSICIÓN FIBRILAR EN EL *M.G. medius* DE CABALLOS PURA SANGRE VENEZOLANOS

Effect of Training on Enzyme Activities and Fibrillar Composition in the *M.G. medius* of Venezuelan Thoroughbred

Luis Eduardo Sucre P.¹, Noelina Hernández² y Sonia Hecker-Torres²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4583. Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

²Sección de Adaptación Muscular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Apartado 50587. Caracas 1050, Venezuela

RESUMEN

Se tomaron biopsias musculares por punción percutánea del *M.G. medius* de veinte (20) yeguas Pura Sangre de Carreras, clínicamente sanas y de edades comprendidas entre 3-4 años. Diez (10) de los ejemplares no habían recibido entrenamiento, las diez (10) restantes, se encontraban activamente entrenadas, por un período de cuatro (4) meses. Secciones transversales seriadas de los especímenes de biopsia muscular fueron examinadas para la ATPasa miosínica, después de preincubaciones ácidas (pH 4,37; 4,6 y 4,8) y alcalina (pH 10,3). Las fibras musculares se identificaron como tipo I, IIA y IIB. La capacidad oxidativa de los tipos de fibras, fue determinada mediante el uso de la reacción histoquímica para la NADH-diaforasa. El área promedio de los tipos de fibras, así como el número de capilares intermiofibrilares adyacentes a cada tipo de fibra, se analizaron utilizando la técnica de la reacción α -amilasa PAS. Los análisis bioquímicos de las actividades de las enzimas musculares β -Hiroxiacil-CoA-deshidrogenasa (HAD), citrato sintetasa (CS) y hexoquinasa (HK), se determinaron fluorométricamente. Los caballos entrenados, al cotejarlos con los inactivos, presentaron incrementos significativos ($P < 0,001$) en el % de fibras tipo IIA y una disminución de igual significación ($P < 0,001$) en el % de fibras tipo IIB. Adicionalmente, se observaron en estos ejemplares entrenados, incrementos significativos ($P < 0,025$) y ($P < 0,005$) en el área promedio de las fibras tipo I y IIB respectivamente, y aumentos significativos ($P < 0,025$) en el área promedio de las fibras. En cuanto a la capilaridad, se evidenciaron incrementos significativos ($P < 0,001$) en la densidad capilar, aumentos significativos también

($P < 0,025$) en los capilares adyacentes a las fibras tipo I y una disminución significativa ($P < 0,001$) en el área promedio por capilar adyacente a las fibras tipo IIB. También se observaron elevaciones significativas ($P < 0,001$) en los niveles de actividad de la enzima HAD. Se concluye que el programa de entrenamiento desarrollado por los caballos analizados durante cuatro meses, mejoró la capacidad aeróbica del músculo.

Palabras clave: Pura Sangre de Carrera, *M.G. medius*, entrenamiento, histoquímica, bioquímica.

ABSTRACT

Muscular biopsies by percutaneous puncture were performed from *M.G. medius* of twenty (20) mares' Thoroughbred clinically healthy (3-4 years old). Ten (10) of these horses were untrained, while the other ten (10) were actively trained by four (4) months. Serial sections of muscle were examined histochemically for myosin adenosinetriphosphatase (myofibrillar ATP-ase) after either acid (pH 4.37, 4.6 and 4.8) or alkaline (pH 10.3) preincubation, and then muscle fibres were identified as types I, IIA and IIB. The oxidative capacity of types of fibres was assessed, using NADH-diaforase stain, and the number of intermyofibrillar capillaries adjacent to each fibre were counted after staining, using the α -amylase-PAS technique. Biochemical analyses involved the fluorometric measurement of β -hydroxy-acyl-coenzyme A dehydrogenase (HAD), citrate sintetase (CS) and hexoquinase (HK). The trained horses, showed a significant increase ($P < 0.001$) in the percentage distribution of o type IIA fibres, and significant diminution ($P < 0.001$) in proportion of the type IIB, in comparison with untrained horses. Additionally was showed in trained horses significant increase in the mean area of fibres type I ($P < 0.025$),

and type IIB ($P < 0.005$), and significant increase ($P < 0.025$) in area mean of fibres. In relation with capillarity, the trained horses showed increase in the capillary density ($P < 0.025$), number of capillaries adjacent to fibres type I ($P < 0.001$), and diminution ($P < 0.001$) in mean area of fibre type IIB. The enzyme activity of HAD was higher ($P < 0.001$) in trained horses than untrained horses. It is concluded that the training program developed by horses during 4 month, induced changes, which improved the aerobic capacity of the muscle.

Key words: Thoroughbred, *M.G. medius*, training, histochemistry, biochemistry.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que el Caballo Pura Sangre de Carrera (CPSC), se ha considerado como un animal atleta élite dentro de las especies domésticas [20, 54, 48, 74], por poseer entre otras peculiaridades, una alta capacidad aeróbica en sus fibras musculares esqueléticas, Tipo I y IIA [10], se ha observado que durante la ejecución de un galope a máxima velocidad (11 a 13,3 m/seg) [2, 26], sus fibras musculares utilizan grandes cantidades de glucógeno, y pueden ser activados (reclutados) todos los miofenotipos de fibras I \rightarrow IIA \rightarrow IIB [9, 14, 19, 45, 76]. Esta forma armónica y ordenada de involucrarse los distintos tipos de fibras, obedece a la intensidad del esfuerzo muscular, y al tamaño de las distintas unidades motoras [47, 48, 74]. La utilización de todas las reservas de glucógeno por parte de las distintas fibras musculares al ser reclutadas, trae como consecuencia acúmulo de ácido láctico y de otros intermediarios, tanto en el ámbito muscular, como en la sangre [2, 17, 24, 25, 26, 47, 48, 56, 66, 70, 71, 72, 73, 78, 84, 85].

La acumulación de lactato en conjunto con la de protones dentro de la fibra muscular esquelética durante la ejecución de un ejercicio físico [1, 86], se traduce a la postre en una disminución marcada del pH intramuscular (de un pH en reposo cercano a 7, disminuye por el ejercicio a un pH 6,4 ó 6,2) [27, 66, 86], y esto último podría interferir con el funcionamiento de las vías metabólicas [66] y con la contracción de las miofibrillas [8, 15, 40]. Conjuntamente con esta disminución del pH intramuscular, pueden ocurrir varios eventos bioquímicos que pueden conducir a una disminución superior al 50% del contenido de ATP de las fibras musculares esqueléticas [25, 33, 72], así como a la liberación por parte de la fibra muscular de iones potasio a la circulación, elevando la concentración de este electrolito en el plasma del equino a 9,4 -10 mmol/litro [70], sobre todo en condiciones climáticas donde se combinan la humedad y las altas temperaturas [28].

Las variaciones antes indicadas a nivel celular, en conjunto con la reducción de la excitabilidad del sarcolema [8], son capaces de producir alteraciones en el proceso de acoplamiento de la excitación-contracción [11]. Esto último, aunado a la limita-

da disponibilidad de sustratos para producir compuestos de alta energía [66], representan parte de los mecanismos fundamentales de la fatiga muscular periférica [11, 66, 70, 73, 86].

La fatiga muscular periférica en los caballos Pura Sangre de Carrera (CPSC) y Trotones, representa uno de los principales factores que limitan la máxima capacidad de desempeño atlético de un ejemplar [42, 71]. Debido a esto, es que la gran mayoría de los trabajos relacionados con fisiología del ejercicio del equino, están orientados a prevenir o retardar su aparición, a través de programas de entrenamiento sistemáticos [24, 70, 71, 78]. En este contexto, los estudios en CPSC relacionados a dichos programas de entrenamiento durante la fase de crecimiento (potros) y en adultos, han demostrado que debido a la alta plasticidad de cambio que posee el músculo esquelético [67, 68, 87], éste puede sufrir cambios profundos en sus características morfológicas y metabólicas, cuando es sometido a períodos prolongados de ejercicio incrementado [46, 67, 68]. Tales modificaciones son de mayor significado en los ejemplares entrenados para distancias superiores a $> 2.000\text{m}$ (resistencia) que para los entrenados para distancias inferiores a $< 1.500\text{m}$ (velocidad) [12]. En atletas humanos entrenados para desempeños anaeróbicos, esto mismo se ha observado [41]. Los cambios mencionados se traducen en el músculo esquelético en un incremento en el cociente de fibras Tipo IIA/IIB [13, 14, 22, 29, 30, 34, 35, 37, 43, 44, 47, 49, 50, 51, 61, 62, 63, 64, 75, 83, 87], acompañado además por aumentos en la capilaridad [2, 3, 6, 29, 30, 34, 60, 65], en el área promedio de los principales miofenotipos de fibras (I, IIA y IIB) [47, 49, 50, 62, 83], en el volumen y densidad mitocondrial [81] y con cambios concomitantes en las actividades de las enzimas claves que intervienen en las diferentes vías metabólicas (\uparrow aeróbicas y \downarrow anaeróbicas) [18, 46, 77, 78, 79, 80, 81]. Con relación a esto último, se han descrito incrementos en las actividades de las enzimas β -OH-Acyl-CoA-Deshidrogenasa (HAD) y Citratosintetasa (CS) [10, 12, 21, 33, 35, 36, 43, 47, 63, 64, 75, 77, 84, 85] y disminución de la actividad de las enzimas Triosafofato Deshidrogenasa (TpDH) y Lactato deshidrogenasa (LDH) [10, 12, 21, 22, 33, 35] Además, se han reportado incrementos en la subunidad H de la enzima LDH [21], así como en la reacción histoquímica de las fibras a la enzima oxidativa NADH-diaforasa [14, 33, 47, 48, 50, 51].

Las modificaciones señaladas por efecto del entrenamiento en la composición miofibrilar, así como en las actividades de las enzimas claves del metabolismo aeróbico y anaeróbico, han servido para evaluar las condiciones atléticas en el humano [31, 39, 40, 41, 79] y en los equinos [12, 19, 20, 33, 47, 84, 85] sometidos a un régimen determinado de entrenamiento. En este contexto de ideas, el propósito del presente estudio fue evaluar los cambios en los parámetros antes señalados, en el *M.G. medius* del CPSC venezolano, sometidos a un régimen de entrenamiento aeróbico por un período de cuatro (4) meses aproximadamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de la presente investigación, se tomaron biopsias por punción percutánea al *M.G. medius* de veinte (20) yeguas Pura Sangre de Carrera venezolanas, clínicamente sanas y de edades comprendidas entre 3 y 4 años. Diez (10) de las yeguas analizadas, se encontraban confinadas en un establecimiento de cría (Haras "Los Samanes", ubicado en Belén, estado Carabobo), y no habían sido sometidas a programas de entrenamiento específico, por un período aproximado de tres (3) meses. Las diez (10) restantes, se encontraban bajo un régimen de entrenamiento de resistencia de aproximadamente cuatro (4) meses, en el Hipódromo "La Rinconada" de Caracas, Venezuela.

El programa de entrenamiento consistió, en trotos de una (1) hora, con velocidades aproximadas de 3 m/seg y galopes medios de velocidades aproximadas de 8-10 m/seg, durante un (1) minuto. Estos ejercicios se realizaron en la mañana dos o tres veces por semana. Con relación a las distancias recorridas y el tiempo de ejercicio ejecutado por los ejemplares en cada sesión, éstas consistieron en 400, 700, 1.000 y 2.000 m, y de 1 a 2 horas. La distancia y el tiempo de ejercicio, se incrementaron en cada ejemplar, según el progreso de su preparación física.

Para la toma de los especímenes de biopsia muscular, se seleccionó al *M.G. medius*, porque existen experiencias anteriores indicativas que señalan que la región de la grupa no involucra riesgo tanto para la práctica de inyecciones profundas, así como para la toma de la biopsia muscular [44, 52, 55, 75, 82]. Además de estos aspectos, se consideró el papel que juega este músculo en la propulsión del cuerpo en el espacio durante la locomoción [69], por lo cual este músculo constituye un interesante modelo para el análisis de las transformaciones fisiológicas [47, 48, 52, 75] y patológicas [82] que pueden sufrir las fibras musculares esqueléticas por efecto del ejercicio físico.

Descripción de la técnica de biopsia muscular sobre el músculo glúteo medio

En todos los casos, las biopsias fueron tomadas permaneciendo los caballos en estación sin traquilización previa. Para ello, se tomaron referencias anatómicas concretas, realizándose las biopsias sobre el área que dista 3 cm dorsal al límite entre los tercios craneal y medio de la línea que une el centro de la espina iliaca ventral con el punto más culminante de la porción caudal del trocánter mayor del fémur [52, 55, 74, 82]. La zona seleccionada, se rasuró y se asepsizó un área de 5-10 cm². A continuación, se inyectó por vía subcutánea 3 ml de clorhidrato de procáina (Novocaína[®], solución al 2%) con una aguja recta de 0,8 mm x 25 mm a lo largo de la línea prevista, la cual puede afectar a la piel y la fascia de revestimiento

externo del músculo, pero no al tejido muscular subyacente, pues ello puede alterar las características de la muestra [51, 74, 82]. Transcurridos entre 3 a 5 minutos de la infiltración anestésica, se procedió a la intervención propiamente dicha. Para ello se incide (aproximadamente 5 mm) la piel, tejido subcutáneo y fascia glútea con hojilla de bisturí Nº 4.

La aguja de biopsia muscular diseñada por Bergström [5], se insertó en el espesor del músculo (procurando que todas las muestras, se obtuvieran a una profundidad de 6 cm) con dirección ventromedial y con la ventana de la aguja dirigida hacia arriba o hacia un lado. Para ello, se retiró de forma parcial el cilindro interno cortante, al tiempo que la aguja se comprimió con suavidad contra la masa muscular mediante un movimiento de palanca, para favorecer así la entrada del tejido muscular a través de la ventana. En este momento, el cilindro interno cortante se introdujo, produciéndose con este movimiento la sección de muestra muscular.

Antes de extraer la aguja, esta operación se repitió de 2 a 3 veces, a objeto de obtener una cantidad suficiente de tejido muscular (aprox. 50-200 mg de tejido). Finalmente, la aguja se extrajo con suavidad del músculo, y la muestra (ya con la aguja fuera del músculo) se sacó del interior del cilindro interno cortante con la ayuda del estilete. Al extraer la aguja se empapó la superficie de la piel con un algodón embebido en alcohol isopropílico, haciendo presión con los dedos índice y pulgar sobre el área, con el propósito de hacer hemostasis. La operación se concluyó con la disposición sobre la herida quirúrgica de sustancias cicatrizantes y antisépticas.

Posterior a los procedimientos de recolección de biopsias, los caballos fueron sometidos a una inspección visual, a objeto de determinar algún grado de claudicación o de alteraciones en el caminar, atribuibles a los procedimientos de extracción de los especímenes de biopsia muscular. Así mismo, se recomendó al encargado de los ejemplares que se encontraban en entrenamiento, que no ejercitaran después de la biopsia muscular.

Los especímenes de biopsia muscular una vez obtenidos, se dividieron en dos porciones, para los análisis histoquímicos y bioquímicos propuestos para esta investigación.

Análisis histoquímico

Los especímenes de biopsia muscular destinados para histoquímica, se montaron en discos de corcho cubiertos con papel de aluminio y se cubrieron con OCT (Tissue tek., Miles Sci., USA) y se sumergieron de inmediato en isopentano en frío (-60°C) por 2 ó 3 minutos. A continuación, las muestras se mantuvieron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

Se realizaron secciones transversales seriadas de un espesor de 10 µ y de 16 µ (para la estimación cualitativa de glucógeno) en un criostato a -20°C, siendo montadas sobre una laminilla o cubreobjeto, para realizar las reacciones histo-

químicas, para la Adenosina trifosfatasa miofibrilar (ATPasa miosínica), a un pH de preincubación alcalino (10,3) y pHs de preincubación ácido (4,8; 4,6 y 4,37) [7], para la Nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH-diaforasa) [58]. Para obtener un estimado cualitativo del contenido de glucógeno, se utilizó la reacción con el ácido periódico Schiff (PAS) [59].

Los capilares, se visualizaron utilizando el método recomendado por Henckel [29, 30], el cual se basa en la presencia de mucopolisacáridos que reaccionan con el PAS, tiñéndose tanto el glucógeno de las fibras como la membrana basal del endotelio capilar [59]. Para ver los capilares, el glucógeno fue digerido previamente por la α -amilasa, poniéndose de manifiesto los mucopolisacáridos de la membrana basal de las fibras y de los capilares [3, 6], FIG. 1.

Sobre las microfotografías en blanco y negro tomadas a esta reacción (α -amilasa-PAS), a través del uso de un analizador de imágenes (Microcomputer Graphic Data Analyser System) marca LADD, se determinó el área promedio de cada tipo de fibra (I, IIA y IIB). Así mismo sobre las microfotografías, se analizó la densidad capilar (capilares/mm²), el índice capilar (N° de capilares/N° de fibras), y el número de capilares adyacentes a cada fenotipo de fibra (I, IIA y IIB), siguiendo el protocolo descrito por Brodal y col. [6]. Además de estas variables, se calculó el área promedio capilar adyacente a cada tipo de fibra (I, IIA y IIB).

La clasificación de los miofenotipos de fibras, se realizó según la nomenclatura propuesta por Brooke y Kaiser [7] (Tipos I, IIA y IIB), FIGS. 2 y 3. También se tomó en consideración las recomendaciones de Andrews y Spurgeon [4], contándose un mínimo de 200 fibras en cada muestra.

El potencial metabólico oxidativo de las fibras musculares esqueléticas, se estimó como alto (A), medio (M) o bajo (B), dependiendo de las intensidades de reacción para la enzima Nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH-diaforasa) [58], FIGS. 2 y 4.

Análisis bioquímico

Las muestras destinadas para este fin, se congelaron después de obtenerlas en forma inmediata en nitrógeno líquido y se colocaron en papel de aluminio, y se almacenaron en nitrógeno líquido, hasta su análisis.

Las actividades de las enzimas analizadas fueron: citrato sintetasa (CS: En 4.1.3.7) (como un marcador del potencial oxidativo mitocondrial), la β -Hidroxiacil.CoA-deshidrogenasa (HAD: En 1.1.1.35) (como un marcador del potencial lipolítico) y la hexoquinasa (HK: En 2.7.1.1) (como un marcador del potencial glicolítico).

Las actividades de estas tres enzimas, se analizaron usando la técnica fluorométrica descrita por Lowry y Passoneau [53], a 25°C, expresando los resultados en: $\mu\text{M}/\text{min}$ X gramo de peso húmedo de tejido.

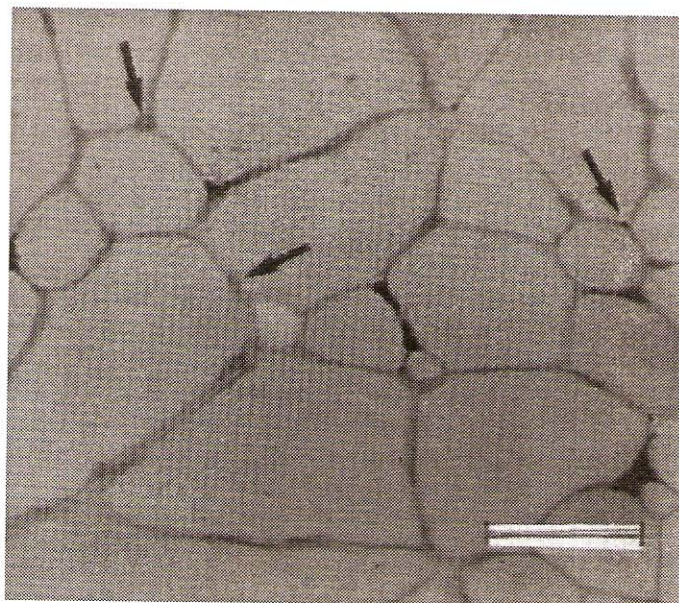


FIGURA 1. MICROGRAFÍA DE SECCIÓN TRASVERSAL DEL *M.G. medius* CORRESPONDIENTE A UN CPSC VENEZOLANO INACTIVO. EN ESTA MICROGRAFÍA SE EXHIBE LA REACCIÓN α -amilasa PAS. NOTE LA PRESENCIA DE LOS CAPILARES ALREDEDOR DE LAS FIBRAS MUSCULARES (cabezas de flechas). LA BARRA REPRESENTA 100 μm .

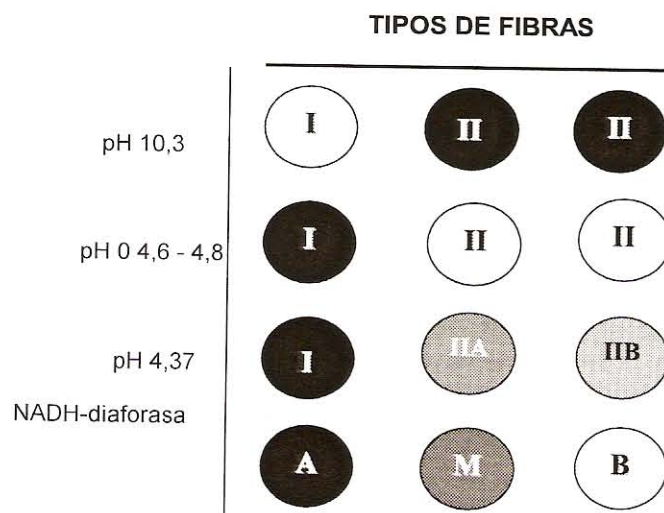


FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS (I, IIA y IIB), DETERMINADAS MEDIANTE LA INTENSIDAD DE REACCIÓN A LA ENZIMA mATPasa FIBRILAR TRAS PREINCUBACIÓN A pH ALCALINO (10,3) Y ÁCIDO (4,8; 4,6 y 4,37). ASÍ MISMO SE EXHIBE EN FORMA ESQUEMÁTICA, LAS DISTINTAS INTENSIDADES DE REACCIÓN HISTOQUÍMICA (A = alta, M = media y B = baja), PARA LA ENZIMA NADH-diaforasa.

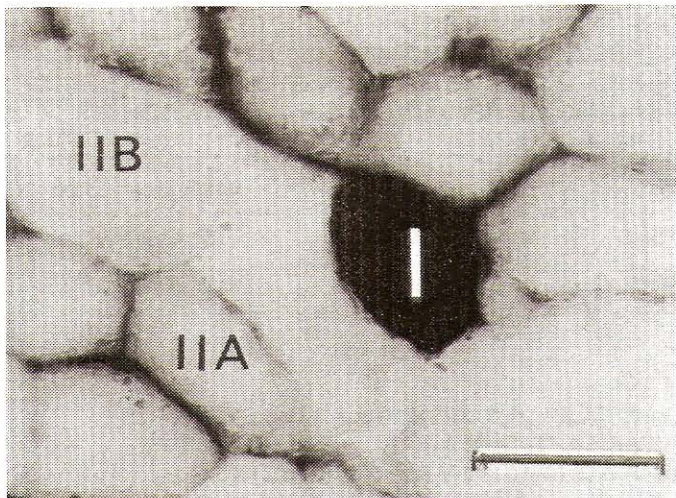


FIGURA 3. MICROGRAFÍA DE SECCIÓN TRANSVERSAL DEL *M.G. medius* CORRESPONDIENTE A UN CPSC VENEZOLANO INACTIVO. EN ESTA FIGURA, SE ILUSTRAN LA REACCIÓN DE LA ATPasa MIOFIBRILAR A pH DE PREINCUBACIÓN 4,37 (FIBRAS TIPO I, IIA y IIB). LA BARRA REPRESENTA 100 μ m.

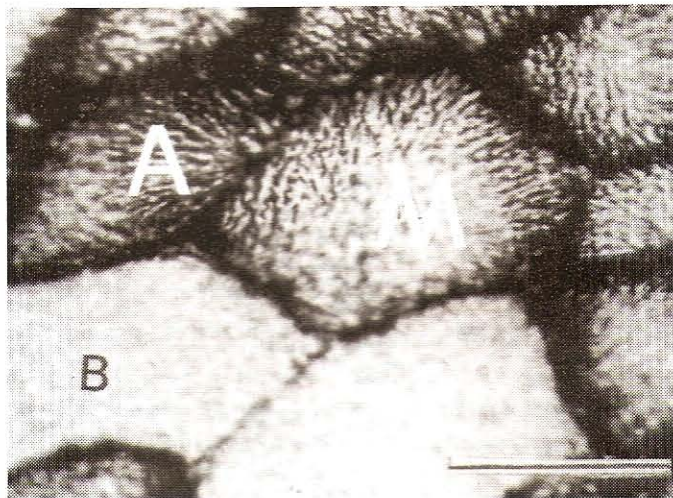


FIGURA 4. MICROGRAFÍA DE SECCIÓN TRANSVERSAL DEL *M.G. medius* CORRESPONDIENTE A UN CPSC VENEZOLANO INACTIVO. EN ESTA MICROGRAFÍA SE ILUSTRAN LA REACCIÓN HISTOQUÍMICA PARA LA NADH-diaforasa (Alta: A, Media: M y Baja: B). LA BARRA REPRESENTA 100 μ m.

TABLA I

PROMEDIO \pm ds DE LOS TIPOS DE FIBRAS EXPRESADOS EN PORCENTAJE (%) EXISTENTES EN EL *M.G. Medius* DE UNA MUESTRA DE VEINTE (20) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERAS VENEZOLANOS, DIEZ (10) INACTIVOS Y DIEZ (10), ENTRENADOS POR UN PERÍODO DE CUATRO (4) MESES

Estado de Entrenamiento	Fibras Tipo		
	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
Inactivos (n = 10)	10,04 \pm 0,57NS	33,68 \pm 0,22**	55,23 \pm 0,37**
Entrenados (n = 10)	11,10 \pm 0,77	52,44 \pm 0,31	37,11 \pm 0,50

** P < 0,001 vs. entrenados. NS = no significativo.

Análisis estadístico

Los resultados exhibidos en las TABLAS, se expresan como media \pm ds. Para comparar los grupos de ejemplares estudiados, se utilizó el test "t" de Student [57]. Las correlaciones se obtuvieron por el método de los cuadrados mínimos [57].

RESULTADOS

Análisis histoquímico

• **Distribución de los tipos de fibras:**

La TABLA I muestra la distribución porcentual (%) de los miofenotipos de fibras (I, IIA y IIB), en el *M.G. medius* de 20 (10 inactivos y 10 entrenados) CPSC venezolanos. En esta TABLA se observa una diferencia significativa (P<0,001) en el porcentaje de las fibras Tipo IIA, en los caballos entrenados por cuatro (4) meses, al comparar este porcentaje (%), con el correspondiente a los caballos inactivos. De igual modo, se evidencia en esta TABLA, una diferencia significativa (P<0,001) en los porcentajes (%) de las fibras Tipo IIB, al comparar los grupos de ejemplares en estudio. No se observaron

diferencias entre ambos grupos de caballos, al comparar los porcentajes de las fibras tipo I.

Al establecer las correlaciones entre los porcentajes de los principales miofenotipos de fibras (I, IIA y IIB) en las yeguas entrenadas y en las inactivas, se evidenció que existe una correlación negativa y significativa (P<0,01) entre el porcentaje de fibras Tipo IIA con relación al porcentaje de fibras TIPO IIB, en los caballos entrenados, al comparar esta correlación con los ejemplares inactivos, TABLA II.

• **Potencial metabólico oxidativo:**

La TABLA III, exhibe los resultados del análisis cualitativo (expresado en porcentaje) de la reacción histoquímica para la NADH-diaforasa. En esta TABLA se hace evidente que el potencial oxidativo en las fibras musculares esqueléticas de los ejemplares sometidos a un régimen de entrenamiento por cuatro (4) meses, mostró un incremento con tendencia a la significación en el porcentaje de fibras que reaccionan de forma intensa a la NADH-diaforasa, así como una disminución significativa (P<0,025) en el porcentaje de fibras que reaccionan medianamente a esta enzima, al comparar dichos porcentajes con los correspondientes a los ejemplares inactivos.

TABLA II
MATRIZ DE CORRELACIONES ($\mu\text{mol/g}$ DE PESO HÚMEDO/MINUTO)

		% Tipos de Fibras			% NADH-diaforasa			Enzimas Musculares			
		I	IIA	IIB	A	M	A+M	B	HAD	CS	HK
I	IIA	-,50*									
N	IIB	-,82**	,05								
A	A	,14	,20	-,16							
C	M	-,12	-,24	,17	-,82**						
T	A+M	,32	-,24	-,36							
I	B	-,32	,21	,39	-,18	-,25					
V	HAD	,11	-,18	-,26	,34	,02	,56*	-,56			
O	CS	,28	,16	-,25	,19	-,11	,10	-,04	,58*		
S	HK	,42	-,28	-,36	-,20	-,01	,40	-,41	,58*	,66*	
E											
N	IIA	,59									
T	IIB	,36	-,92**								
R	A	-,69*	,93**	-,83**							
E	M	-,44	,83**	-,71**							
N	A+M	,63	,99**	-,88**							
A	B	-,51	-,84**	,91**	-,80**	,52					
D	HAD	,14	-,01	-,09	,22	-,16	,06	-,16			
O	CS	,28	,50	-,30	,62	,28	,53	,27	,80**		
S	HK	,21	,48	-,32			,46		,52	,77*	

*P < 0,05. **P < 0,01. Intensidad de reacción a la enzima NADH-diaforasa Alta (A), Media (M) y Baja (B).

TABLA III
PROMEDIO \pm ds REACCIONES HISTOQUÍMICAS DE LA NADH-diaforasa, EXPRESADO EN PORCENTAJE (%), EXISTENTES EN EL *M.G. Medius* DE UNA MUESTRA DE VEINTE (20) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DIEZ (10) INACTIVOS Y DIEZ (10) ENTRENADOS POR UN PERÍODO DE CUATRO (4) MESES

Estado de Entrenamiento	% NADAH-Diaforasa		
	Alta	Media	Baja
Inactivos (n = 10)	24,60 \pm 0,58 NS	45,83 \pm 0,96*	29,57 \pm 0,54 NS
Entrenados (n = 10)	32,12 \pm 0,98	33,55 \pm 1,59	26,77 \pm 0,47

*P < 0,025 vs. entrenados. NS = no significativo.

Al establecer las correlaciones entre el porcentaje de fibras que reaccionan de forma intensa a la NADH-diaforasa, y el porcentaje de fibras que reaccionan con baja intensidad a esta enzima, se evidenció que existe una correlación negativa y significativa (P < 0,01) en los ejemplares entrenados, al comparar esta correlación con las yeguas inactivas, TABLA II.

• Área promedio de los tipos de fibras:

En la TABLA IV se exhiben los resultados del análisis estadístico, de las áreas promedio de las fibras Tipo I, IIA y IIB, así como el área promedio de las fibras. En esta TABLA, se aprecia que en los ejemplares entrenados, ocurrió un incre-

mento significativo (P < 0,025) y altamente significativo (P < 0,005) en el área promedio de los tipos de fibras I y IIB, al comparar dichas áreas con grupo inactivo. Así mismo, se evidencia una diferencia significativa (P < 0,025) en el área promedio de las fibras en los ejemplares entrenados, al cotejarla con los inactivos.

• Capilaridad:

En las TABLAS V y VI, se muestran los resultados del análisis estadístico de la densidad capilar (cap./mm²), índice capilar (N°cap./N°fibras), capilares adyacentes a cada tipo de fibra (I, IIA y IIB) y el área promedio calculada por capilar ad-

TABLA IV

PROMEDIO \pm ds ÁREA PROMEDIO DE LOS TIPOS DE FIBRAS (I, IIA Y IIB), ASÍ COMO ÁREA PROMEDIO DE LAS FIBRAS, EXPRESADAS EN μm^2 , EXISTENTES EN EL *M.G. medius* DE UNA MUESTRA DE VEINTE (20) CABALLOS PURA SANGRE VENEZOLANOS, DIEZ (10) INACTIVOS Y DIEZ (10) ENTRENADOS POR UN PERÍODO DE CUATRO (4) MESES

Estado de Entrenamiento	Área Promedio de Tipos de Fibras (μm^2)			Área Promedio (μm^2)
	I	IIA	IIB	
Inactivos (n = 10)	2.080,35 \pm 696,5*	3.407 \pm 955.5 NS	3.627,27 \pm 736,5**	2.984,2 \pm 630,3*
Entrenados (n = 10)	3002, 2 \pm 663,3	2816 \pm 714,6	4729 \pm 1.147,9	3.736 \pm 1.058,8

**P < 0,005 vs. entrenados. * P < 0,025 vs. entrenados. NS = no significativo.

TABLA V

PROMEDIO \pm ds DE LA DENSIDAD CAPILAR (cap./mm²) E INDICE CAPILAR (N^ocap/N^ofibras), EXISTENTES EN EL *M.G. medius* DE UNA MUESTRA DE VEINTE (20) CABALLOS PURA SANGRE VENEZOLANOS, DIEZ (10) INACTIVOS Y DIEZ (10) ENTRENADOS POR UN PERÍODO DE CUATRO (4) MESES

Estado de Entrenamiento	Densidad Capilar (cap./mm ²)	Indice Capilar (N ^o cap/N ^o fibras)
Inactivos (n = 10)	436,75 \pm 7,12**	2,11 \pm 0.019 NS
Entrenados (n = 10)	560,9 \pm 9,24	2,02 \pm 0.03

**P < 0,001 vs entrenados. NS = no significativo.

TABLA VII

PROMEDIO \pm ds DE LAS ACTIVIDADES MUSCULARES ($\mu\text{mol/g/minuto}$) DE LAS ENZIMAS CITRATO SINTETASA (CS), 3-OH-acyl-CoA DESHIDROGENASA (HAD) Y HEXOQUINASA (HK), EXISTENTES EN EL *M.G. medius* DE UNA MUESTRA DE VEINTE (20) CABALLOS PURA SANGRE VENEZOLANOS, DIEZ (10) INACTIVOS Y DIEZ (10) ENTRENADOS POR UN PERÍODO DE SEIS (6) MESES

Estado de Entrenamiento	CS	HAD	HK
Inactivos (n = 10)	25,87 \pm 0,64 NS	12,36 \pm 6,51**	0,97 \pm 0,46 NS
Entrenados (n = 10)	29,91 \pm 4,7	24,53 \pm 3,63	0,83 \pm 0,1

P < 0,001 vs. entrenados. NS = no significó.

TABLA VI

PROMEDIO \pm ds CAPILARES ADYACENTES A CADA TIPO DE FIBRA (I, IIA Y IIB) Y ÁREA PROMEDIO CALCULADA POR CAPILAR ADYACENTE A CADA TIPO DE FIBRA (I, IIA Y IIB) (μm^2), EXISTENTES EN EL *M.G. Medius* DE UNA MUESTRA DE VEINTE (20) CABALLOS PURA SANGRE VENEZOLANOS, DIEZ (10) INACTIVOS Y DIEZ (10) ENTRENADOS POR UN PERÍODO DE CUATRO (4) MESES

Estado de Entrenamiento	Capilar Adyacente a cada Tipo de Fibra			Área Promedio por Cap. Ady. a cada Tipo de Fibra (μm^2)		
	I	IIA	IIB	I	IIA	IIB
Inactivos (n = 10)	4,38 \pm (0,05)*	5,15 \pm (0,05) NS	5,30 \pm (0,07) NS	516,08 \pm (10,4) NS	553,12 \pm (9,3) NS	913,28 \pm (28,3)**
Entrenados (n = 10)	5,5 \pm (0,04)	5,24 \pm (0,05)	5,28 \pm (0,05)	524,87 \pm (11,63)	638,47 \pm (18)	696,64 \pm (8,8)

*P < 0,025 vs. entrenados. **P < 0,001 vs. entrenados. NS = no significativo.

yacente a cada tipo de fibra (I, IIA y IIB). El estudio de tales variables, reveló que existe un aumento significativo en la capilaridad en el grupo de caballos entrenados, reflejado esto último por un aumento significativo (P<0,001) en la densidad capilar, TABLA V, un incremento significativo (P<0,025) en los capilares adyacentes a las fibras tipo I, TABLA VI y una disminución significativa (P<0,001) del área promedio calculada por capilar adyacente a las fibras tipo IIB, TABLA VI, con relación a los ejemplares inactivos.

Análisis bioquímico

En la TABLA VII, se exhiben los resultados del análisis de las actividades de las enzimas musculares (expresadas en $\mu\text{M/min X g}$ de peso húmedo de tejido): β -Hidroxiacyl-CoA-des-hidrogenasa (En: 1.1.1.35: HAD), citrato sintetasa (En: 4.1.3.7: CS) y Hexoquinasa (En: 2.7.1.1:HK). En esta TABLA, es evidente el aumento significativamente mayor (P<0,001) en los niveles de actividad de la enzima HAD en los ejemplares entrenados, al comparar dichos niveles con los correspondientes

al grupo de animales inactivos. Adicionalmente, al establecer la correlación entre las actividades de las enzimas musculares HAD y CS en los grupos de caballos bajo estudio, se observó que dicha correlación en los animales inactivos fue positiva y significativa ($P < 0,05$), mientras que en los ejemplares entrenados fue positiva y altamente significativa ($P < 0,01$), TABLA II.

DISCUSIÓN

En el ámbito muscular, todo programa de entrenamiento pretende optimizar el desarrollo de las cualidades innatas de cada caballo [47]. Para esto, el acondicionamiento muscular busca en último término maximizar el rendimiento de las rutas metabólicas generadoras de energía (aeróbicas y anaeróbicas) y minimizar las causas de la fatiga periférica [47, 48].

La cuantificación de los cambios fisiológicos y bioquímicos por efecto del entrenamiento a nivel muscular, tiene una relación directa con la cantidad de actividad contráctil desarrollada durante el período de entrenamiento, vale decir que largas sesiones de ejercicios, generan grandes adaptaciones, como respuesta al entrenamiento [12, 39, 47, 60].

Tal vez una de las adaptaciones más precoces en el músculo esquelético por efecto del ejercicio en el equino, lo constituye el mejoramiento de la capacidad oxidativa, indicada por incremento en la actividad de las enzimas de la β -oxidación de los ácidos grasos, tales como la HAD [47]. Con relación a esto, el umbral de intensidad y duración de cada sesión de ejercicio ejecutada por los caballos bajo estudio en el presente trabajo, alcanzó los niveles necesarios para provocar incrementos significativos ($P < 0,001$) en la actividad de la enzima HAD, TABLA VII. Resultados similares, fueron reportados por otros autores [10, 21, 36, 42, 72,75], en caballos foráneos sometidos a programas de entrenamiento similares. Sin embargo, estos hallazgos están en contraposición con los reportados por Nimmo y Snow [56], los cuales evidenciaron incrementos inconspicuos, en los niveles de esta enzima en ejemplares sometidos a entrenamiento. De igual modo, los resultados no concuerdan con los presentados por Ronéus y col. [65] en caballos Trottones jóvenes, donde no encontraron cambios en los niveles de esta enzima en los caballos entrenados. Tales discrepancias de resultados, podrían estar en íntima relación con la intensidad y duración de los ejercicios ejecutados por estos ejemplares durante el período de entrenamiento.

Los incrementos no significativos en la actividad de la enzima citrato sintetasa (CS) evidenciados en los caballos entrenados, al compararlos con los inactivos, TABLA VII, corroboran los planteamientos de Henkel [29], el cual ha indicado que las adaptaciones del músculo esquelético al entrenamiento, comienzan a tener significación estadística, a partir del cuarto mes de entrenamiento. Sin embargo, estos leves cambios en la actividad de la enzima CS observados en el presente trabajo en los caballos entrenados, se acompañaron con incrementos paralelos y significativos ($P < 0,01$) de la actividad

enzima HAD, TABLA II. Estos hallazgos ratifican lo planteado por otros autores [10, 13, 31, 77, 78, 79, 80, 81] que indicaron que los incrementos en las actividades de las enzimas musculares involucradas en la oxidación del sustrato terminal ocurre en paralelo.

En cuanto al incremento significativo ($P < 0,001$) en la variable porcentaje (%) de fibras tipo IIA, observado en la presente investigación en los caballos entrenados, TABLA I, coincide con reportes previos [10, 21, 30, 33, 75] en CPSC de otras latitudes: Con relación a este incremento en el % de las fibras tipo de fibra IIA, es importante señalar que el mismo, se debe a la conversión de fibras tipo IIB en tipo IIA [47, 51, 61, 62, 75]. La señalada transformación de las fibras IIA \rightarrow IIB depende de la duración [13, 50] y de la intensidad y frecuencia [19, 49] del ejercicio, en donde se involucren de modo reiterativo la participación de las fibras Tipo IIB [47, 48, 50, 75]. En este sentido, al establecer las correlaciones entre los porcentajes de fibras Tipo IIA y el correspondiente de las fibras Tipo IIB, en las yeguas sometidas al régimen de entrenamiento por un período de cuatro meses, se evidenció una correlación negativa y significativa ($P < 0,01$), TABLA II.

Es importante señalar que el régimen de entrenamiento aplicado a los animales, no alteró, al igual que lo han reportado otros autores [10, 12, 13, 21, 22, 29, 30, 34, 35, 36, 42, 46, 48, 49, 50, 60, 71, 81, 85], el cociente de fibras Tipo I/II. Esto último tiene mucha importancia, ya que el programa de entrenamiento en las yeguas estudiadas, no modificó las características de contracción rápida del *M.G. medius*, manteniéndose con esto la aptitud de esta raza de equinos que la ha capacitado genéticamente para la ejecución de ejercicios explosivos y de corta duración [47, 48, 54, 75].

López-Rivero y col. [50], han indicado que el reclutamiento reiterativo de las fibras Tipo IIB, durante las sesiones de ejercicios, además de incrementar el cociente de las fibras IIA/IIB, puede inducir transformaciones metabólicas en las fibras Tipo IIB, trayendo como consecuencia incrementos en los porcentajes de fibras que reaccionan intensamente a la NADH-diaforasa. Del mismo modo, Snow [75] señaló que en el músculo esquelético del CPSC, se pueden generar durante el régimen de entrenamiento, un amplio espectro de fibras que reaccionan de forma mediana e intensamente a la enzima NADH-diaforasa, y que muy probablemente el origen de tales fibras, lo constituyan las fibras Tipo IIB. Con relación a esto último, al establecer la correlación entre el % de fibras Tipo IIA y el % de fibras que reaccionan de forma intensa a la NADH-diaforasa en los ejemplares entrenados, se observó que fue positiva y significativa ($P < 0,01$), TABLA II. Del mismo modo, la correlación entre los % de fibras Tipo IIA y la sumatoria de fibras alta y medianamente oxidativas, también fue positiva y significativa ($P < 0,01$) en los ejemplares entrenados; TABLA II. En imagen en espejo, la correlación entre los % de fibras Tipo IIB y el % de fibras de reacción intensa a la NADH-diaforasa fue negativa y significativa ($P < 0,01$), TABLA II, y de igual modo, al establecer la correlación entre el % de fibras Tipo IIB y la su-

matoria de fibras alta y medianamente oxidativas, se evidenció que fue negativa y significativa ($P < 0,01$), en los caballos entrenados, TABLA II. Tales hallazgos permiten sugerir que el incremento en el % de fibras Tipo IIA por efecto del ejercicio físico, se acompañó con un aumento en el potencial oxidativo de las fibras. Estos resultados, apoyan los trabajos presentados por Essén-Gustavsson y Lindholm [13], Ronéus y col. [64]. y Valberg y col. [85].

Los incrementos en la capilaridad, representan otra de las respuestas más comunes del músculo esquelético al entrenamiento [3, 6, 47, 75], si se realizan los ejercicios con la suficiente duración e intensidad [29]. Con relación a esto último, el efecto del entrenamiento sobre el músculo esquelético de los CPSC venezolanos, también permitió incrementos significativos en la capilaridad, reflejado por aumentos significativos ($P < 0,025$) en el número de capilares adyacentes a las fibras tipo I, TABLA VI, lo cual concuerda con los hallazgos de Hodgson y Rose [34] para caballos sometidos a entrenamiento. Del mismo modo, los aumentos significativamente mayores ($P < 0,001$) en la densidad capilar en los caballos entrenados, TABLA V, se corresponden con los obtenidos por Henkel [29]. Sin embargo, las adaptaciones circulatorias en el músculo esquelético (en cuanto a la capilaridad se refiere) observados en el presente trabajo, no se corresponden con los reportes de Hodgson y col. [36], tal vez por el carácter de submáximo del programa de entrenamiento.

Es interesante señalar que la estimación de la densidad capilar depende tanto de la relación fibra-capilar, así como del tamaño fibrilar [6, 38]. Se ha señalado que la irrigación de cada tipo de fibra está estrechamente relacionada a la capacidad oxidativa de las mismas [38, 47, 75]. En este sentido, las fibras Tipo I, tienen una mayor irrigación que las Tipo IIA, las que a su vez están irrigadas por un mayor número de capilares que las fibras Tipo IIB. Por lo tanto, aquellos músculos que presentan una gran cantidad de fibras Tipo IIB, muestran una baja capilaridad. Así mismo, el grosor fibrilar presenta una relación inversa con la distribución capilar y por ende, influye en relación fibra-capilar. En este sentido, se ha determinado que el grosor de las fibras tipo I, es $<$ al de las Tipo IIA, y el de las Tipo IIA es $<$ al correspondiente de las fibras Tipo IIB, y por tanto, este último tipo de fibra posee una menor irrigación sanguínea [38]. Con relación a lo planteado, los incrementos en el % de fibras Tipo IIA (a expensa de las fibras tipo IIB), TABLA I, y en la capacidad oxidativa de las fibras, TABLA III, se acompañaron con aumentos en la capilaridad, TABLAS V y VI, en las yeguas entrenadas.

La hipertrofia de las fibras musculares ha sido asociada a programas de entrenamiento de fuerza [41, 46] y de resistencia [49, 50]. A pesar de lo indicado, autores como Giddins y Gonyea [16], Hall-Craggs [23] y Ho y col. [32], han observado que en animales de experimentación (gatos y roedores) sometidos a un programa de ejercicios de levantamiento de cargas, se produjo una hiperplasia, más que una hipertrofia, producto

posiblemente a la excisión de las fibras musculares, por efecto del esfuerzo muscular.

Las adaptaciones del tamaño fibrilar al entrenamiento, no son idénticas en todas las razas de equinos, ya que dicha adaptación está en íntima relación con la dinámica (velocidad y/o resistencia) particularizada de cada raza de caballos [47, 49, 60]. En relación con las adaptaciones del tamaño de las fibras musculares esqueléticas en los CPSC venezolanos sometidos a entrenamiento, se observó un aumento significativo ($P < 0,025$) en el área promedio de los tipos de fibras I y altamente significativo ($P < 0,005$) en las fibra Tipo IIB, TABLA IV, estas observaciones coinciden con las de Henkel [29] y Taylor Brassard [83] que trabajaron con caballos Trotones sometidos a entrenamiento, y con las de López-Rivero y col. [51] que analizaron el efecto del entrenamiento en caballos Árabes y Andaluces. Sin embargo, Essén-Gustavsson y Lindholm [13] reportaron en ejemplares entrenados que las áreas de las fibras IIA y IIB fueron significativamente menores al cotejarlas con las correspondientes al grupo de caballos inactivos, lo cual podría deberse a un proceso de rompimiento (excisión) de las fibras musculares, tal como se ha descrito para el entrenamiento de otros mamíferos [16, 23, 32].

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El estímulo del entrenamiento por cuatro (4) meses, aplicado a los CPSC venezolanos estudiados, fue lo suficiente para reclutar todos los tipos de fibras durante las sesiones de ejercicios. Así mismo, la intensidad y duración de tales ejercicios fueron capaces de provocar incrementos en el cociente de los tipos de fibras IIA/IIB, aumentos en la capacidad oxidativa, así como también en capilaridad y en el grosor (hipertrofia) de las fibras I y IIB, FIG. 5.

A pesar de que los cambios señalados en el músculo esquelético de los Caballos Pura Sangre criollos sometidos a entrenamiento, podrían ser mejorados con un régimen de entrenamiento más prolongado, los alcanzados hasta los cuatro meses permiten señalar que el beneficio del programa de entrenamiento, al cual fueron sometidos los ejemplares analizados en el presente trabajo, se traducen en un mayor índice de fatigoresistencia, debido al incremento en la capacidad oxidativa y en la capilaridad. A pesar de tales cambios, el régimen de entrenamiento, no afectó el cociente de fibras Tipo I/I, lo cual le permite conservar la aptitud de realizar ejercicios de velocidad. Estas características indicadas (velocidad y resistencia) además de mejorar el desempeño de un caballo como atleta, constituyen los atributos más codiciables que debe poseer un equino.

Los cambios observados en los ejemplares entrenados, podrían tener mayor repercusión en la búsqueda de mejorar el desempeño atlético de los mismos, si se ajustara el régimen de entrenamiento a las características particulares de cada ejemplar. En este sentido, los análisis histoquímicos y bioquí-

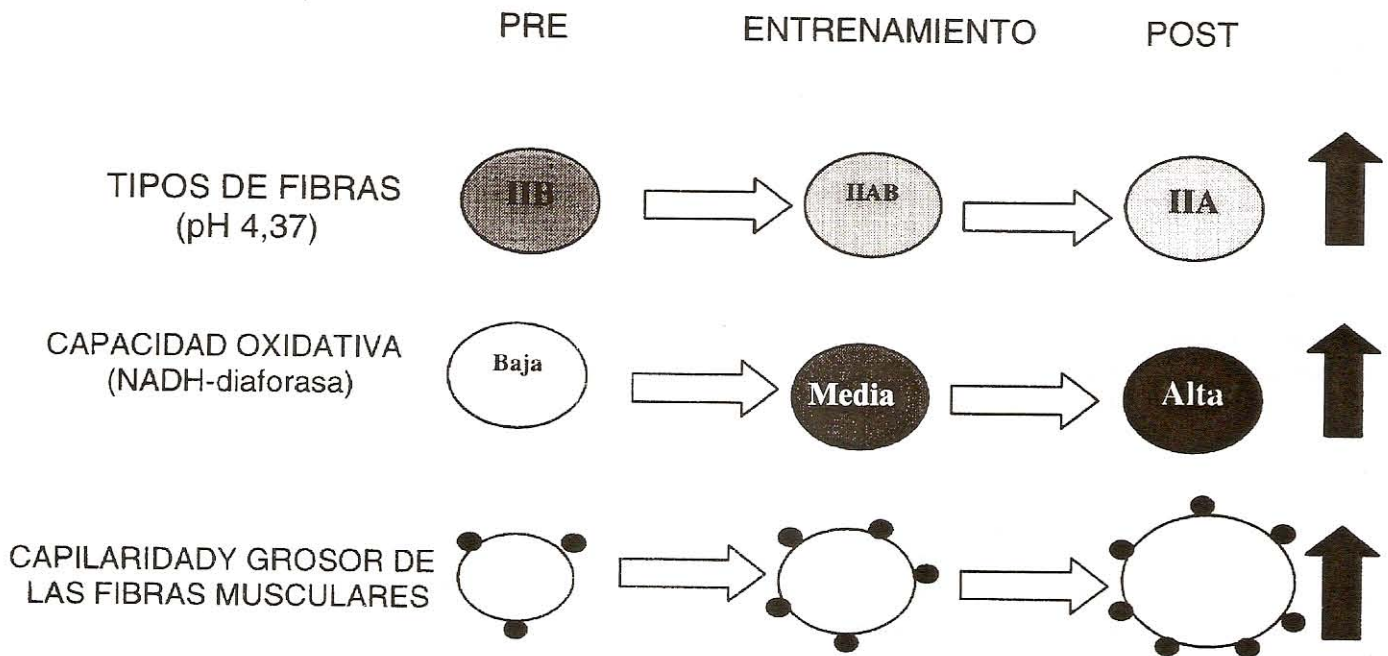


FIGURA 5. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS CAMBIOS QUE OCURREN EN LOS PORCENTAJES DE FIBRAS DE CONTRACCIÓN FÁSICO RÁPIDA O DEL TIPO II, ASÍ COMO EN LA CAPACIDAD OXIDATIVA, LA CAPILARIDAD Y EL GROSOR DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS, POR EFECTO DE UN RÉGIMEN DE ENTRENAMIENTO.

micos, realizados a los especímenes de biopsia muscular de los caballos, previamente antes del programa de entrenamiento, podrían orientar y sugerir a los entrenadores, el régimen de entrenamiento que más se ajuste a cada ejemplar. Con esto se evitarían, eventuales daños en el músculo esquelético que a la postre se traducen en una vida atlética efímera. Así mismo, los análisis musculares antes indicados, realizados posterior al período de entrenamiento, permitirían evaluar los progresos alcanzados por cada ejemplar, y realizar los cambios pertinentes en el régimen de entrenamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AHLBORG, B.; BESTRÖM, J.; EKELUND, L.; HULTMAN, E. Muscle glycogen and muscle electrolytes during prolonged physical exercise. *Acta Physiol. Scand.*, 70: 129-142. 1967.
- [2] ANDERSON, M.G. Effect of exercise on equine blood metabolites. *Equine Vet. J.*, 7: 33. 1975.
- [3] ANDERSEN, P.; HERIKSON, J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: Adaptive response to exercise. *J. Physiol.*, 270: 677-690. 1977.
- [4] ANDREWS, F.M.; SPURGEON, T.L. Histochemical staining characteristic of normal horse skeletal muscle. *Am. J. Vet. Res.*, 47: 1843-1852. 1986.
- [5] BERGSTRÖM, J. Muscle electrolytes in man: Determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens: a study in normal subjects, kidney patients, and patients with chronic diarrhoea. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 14 (Suppl. 68): 1. 1962.
- [6] BRODAL, P.; INGJLER, F.; HERMANSEN, L. Capillary supply of skeletal muscle fibres in untrained and endurance-trained men. *Am. J. Physiol.*, 242: 705-712. 1977.
- [7] BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fibre types: How many and what kind? *Arch. Neurol.*, 23: 369-379. 1970.
- [8] BYRD, S.K.; McCUTCHEON, L.J.; HODGSON, D.R.; GOLLNICK, P.D. Altered sarcoplasmic reticulum function after high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.*, 67: 2072-2077. 1989.
- [9] COSTILL, D.L.; GOLLNICK, P.D.; JANSSON, E.D.; SALTIN, B.; STEIN, E.M. Glycogen depletion pattern in human muscles fibres during distance running. *Acta Physiol. Scand.*, 89: 374-383. 1973.
- [10] CUTMORE, C.M.M.; SNOW, D.H.; NEWSHOLME, E.A. Activities of enzyme of aerobic and anaerobic in middle gluteal muscle from trained and untrained horses. *Equine Vet. J.*, 17: 354-356. 1985.
- [11] EDWARDS, R.H.T. New techniques from study human muscle function metabolism and fatigue. *Muscle Nerve*, 7: 599-609. 1984.
- [12] ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A. Metabolic adaptation to racing over sprinter or stayer distances in Thoroughbred. *Can. J. Sport. Med.*, 13: 11. 1988.

- [13] ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A. Muscle fibre characteristics of actives and inactives Standardbred horse. **Equine Vet. J.**, 17: 434-438. 1985.
- [14] ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; KARLSTRÖM, K.; LINDHOLM, A. Fibre types enzyme activities and substrate utilisation in skeletal muscles of horses competing in endurance rides. **Equine Vet. J.**, 16: 197-202. 1984.
- [15] GIBSON, H.; COOPER, R.G.; STOKES, M.J.; EDWARDS, R.T.H. Mechanisms resisting fatigue in isometrically contracting human skeletal muscle. **Quart J. Exp. Physiol.**, 73: 903-914. 1988.
- [16] GIDDINGS, C.J.; GONYEA, W.J. Morphological observations supporting muscle fibre hyperplasia following Weight lifting exercise in cats. **Anat. Rec.**, 233: 178-195. 1992.
- [17] GLEESON, T.T. Post-exercise lactate metabolism: A comparative review of sites, pathways, and regulation. **Annu. Rev. Physiol.**, 58: 565-581. 1996.
- [18] GOLLNICK, P.D. Metabolic regulation in skeletal muscle: Influence of endurance training as exerted by mitochondrial protein concentration. **Acta Physiol. Scand.**, 128 (Suppl. 556): 53-66. 1986.
- [19] GOTTLIEB, M. Muscle glycogen depletion patterns during draught work in Standardbred horses. **Equine Vet. J.**, 21: 110-115. 1989.
- [20] GUNN, H.M. A perspective an athletic ability. **Irish Vet. J.**, 40: 85-86. 1986.
- [21] GUY, P.S.; SNOW, D.H. Effect of training and detraining on lactate deshydrogenase isoenzymes in the horse. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 75: 863-869. 1977.
- [22] GUY, P.S.; SNOW, D.H. The effect of training and detraining on muscle composition in the horse. **J. Physiol. (Lond.)** 269: 33-51. 1977.
- [23] HALL-CRAGGS, E.C.B. The longitudinal division of fiber in overloaded rat skeletal muscle. **J. Anat.**, 107: 459-470. 1970.
- [24] HARRIS, R.C. Muscle fatigue the other side of performance coin. **Equine Vet. J.**, 17: 409-416. 1985.
- [25] HARRIS, R.C., MARLIN, D.J.; SNOW, D.H. ATP depletion and lactate accumulation thresholds in the exercising Thoroughbred horse. **Can. J. Sport. Sci.**, 13: 15. 1988.
- [26] HARRIS, R.C.; MARLIN, D.J.; SNOW, D.H. Metabolic response to maximal exercise of 800 and 2000 m in the Thoroughbred horse. **J. Appl. Physiol.**, 63: 12-19. 1987.
- [27] HARRIS, R.C.; KATZ, A.; SAHLIN, K.; SNOW, D.H. Measurement of muscle pH in horse muscle and its relation to lactate conten. **J. Physiol.**, 357: 119. 1984.
- [28] HARRIS, P.A.; MARLIN, D.J.; SCOTT, C.M.; HARRIS, R.C.; MILLS, P.C.; MITCHELL, A.R.; ORME, C.E.; ROBERTS, C.A.; SCHROTER, R.C.; MARR, C.M.; BARRELET, F. Electrolyte and total protein changes in non-heat acclimated horses performing treadmill exercise in cool (20°C/40%RH), hot dry (30°C /40%RH), or hot humid (30°C/80%RH) conditions. **Equine Vet. J.**, Suppl. 20: 85-96. 1995.
- [29] HENCKEL, P. Training and growth induced changes in the middle gluteal muscle of young Standardbred trotters. **Equine Vet. J.**, 15: 134-140. 1983.
- [30] HENCKEL, P. A histochemical assessment of capillary blood supply of de middle gluteal muscle of Thoroughbred horses. In: **Equine Exercise Physiology**. Eds. D.H. Snow, S.G.B. Persson and R.J. Rose. Granta Edition, Cambridge: 225-228. 1983.
- [31] HICKSON, R.C.; RENNIE, M.J.; CONLEE, R.K.; WINDER, W.W.; HOLLOSZY, J. O. Effects of increased plasma fatty acids on glycogen utilization and endurance. **J. Appl. Physiol.**, 43: 829-833. 1977.
- [32] HO, K.W.; ROY, R.R.; TWEEDLE, C.D.; HEUSNER, W.W.; VAN HUSS, W.D.; CARROW, R.E. Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats. **Am. J. Anat.**, 157: 433-440. 1980.
- [33] HODGSON, D.R. An update in equine exercise physiology research in North America and throughout the world. **California Vet.**, 41: 7-28. 1987.
- [34] HODGSON, D.R.; ROSE, R.J. Effects of nine-month endurance training programme on muscle composition in the horse. **Vet. Rec.**, 121: 271-274. 1987.
- [35] HODGSON, D.R. Basic muscle physiology, histochemistry, biochemistry and muscle biopsy techniques. **Proceedings of the International Conference for Equine Sports Medicine**. August 1-13. San Diego, California. USA: 18-19. 1986.
- [36] HODGSON, D.R.; ROSE, R.; DIMAURO, J.; ALLEN, R. Effects of training on muscle composition in horses. **Am. J. Vet. Res.**, 47: 12-15. 1986.
- [37] HODGSON, D.R.; ROSE, R.; DIMAURO, J.; ALLEN, R. Effects of submaximal treadmill training programe on histochemical properties, enzyme activities and glycogen utilization of skeletal muscle in horse. **Equine Vet. J.**, 17: 300-305. 1985.
- [38] KARLSTÖM, K.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; HOPPELER, H.; STRAUB, R.; WEISHAUPT, M. Capillary supply and fibre area in locomotor muscles of horses and steer. A comparison between histochemistry and electron microscopy. **Acta Anat.**, 145: 395-399. 1992.

- [39] KATSUTA, S.; KANAO, Y.; AOYAGI, Y. Is exhaustive training adequate preparation for endurance performance? **Eur. J. Appl. Physiol.**, 58: 68-73. 1988.
- [40] KLEIN, C.; CUNNINGHAM, D.A.; PATERSON, D.H.; TAYLOR, A.W. Fatigue and recovery contractile properties of young and elderly men. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 57: 684-690. 1988.
- [41] KOMI, P.V.; RUSKO, V.; VOS, J.; VIHKO, V. Anaerobic performance capacity in athletes. **Acta Physiol. Scand.** 100: 107-114. 1977.
- [42] LINDHOLM, A. Limitations to maximal performance in the Standardbred horse: Some muscle morphological and biochemical aspects, In: **Biochemistry of Exercise VI, International Series on Sports Sciences.**, Edited by B. Saltin, Vol. 16: 455-466. 1986.
- [43] LINDHOLM, A.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; McMIKEN, D., PERSSON, S.; THORTON, J.R. Muscle histochemistry and biochemistry of Thoroughbred horses during growth and training., In: **Equine Exercise Physiology.** Eds. D.H. Snow, S.G.B. Persson and R.J. Rose, Granta Editions, Cambridge.: 211-217.1983.
- [44] LINHOLM, A.; PIEHL, K. Fibre composition enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of Standardbred horses. **Acta Vet. Scand.**, 15: 287-309. 1974.
- [45] LINHOLM, A.; BJERNELD, A.; SALTIN, B. Glycogen depletion pattern in muscle fibres of trotting horses. **Acta Physiol., Scand.**, 90: 475-484. 1974.
- [46] LINDHOLM, A.; SALTIN, B. The physiological and biochemical response of Standardbred horses to exercise of varying speed and duration. **Acta Vet. Scand.**, 15: 310-324. 1974.
- [47] LÓPEZ-RIVERO, J.L. Effect of training on the skeletal muscle of horses (Review). **Agro-Ciencia**, 11: 71-85. 1995.
- [48] LÓPEZ, J.L. Histochemical biochemical and morphological characteristic of skeletal muscle of horse. **Agro-Ciencia**, 9: 113-131. 1993.
- [49] LÓPEZ-RIVERO, J.L.; RUZ, M.C., SERRANO, A.L.; GALISTEO, A.M. Effect of training and detraining on muscle fibre size in several horse breeds. **Arch. Med. Vet.**, 25: 127-136. 1993.
- [50] LÓPEZ-RIVERO, J.L.; AGÜERA, E.; MONTERDE, J.G.; VIVO, J., RODRÍGUEZ-BARBUDO., M. Skeletal muscle fiber size in untrained and endurance-trained horses. **Am J. Res.**, 53: 847-850. 1992.
- [51] LÓPEZ-RIVERO, J.L.; MORALES-LÓPEZ, J.L.; GALISTEO, A.M.; AGÜERA, E. Muscle fibre type composition in untrained and endurance-trained Andalusian and Arab horses. **Equine Vet. J.**, 23: 91-93. 1991.
- [52] LÓPEZ-RIVERO, J.L.; MONTERDE, J.G.; MIRÓ, F., DIZ, A.; MARTÍNEZ-GALISTEO A. Biopsia muscular con aguja percutánea en el caballo: descripción y aplicaciones. **One 2ª época**, 81: 26-28. 1989.
- [53] LOWRY, O.H. PASSONEAU, J.V. "A flexible system of enzymatic analysis". **Academic Press. N.Y.** : 1.1972.
- [54] MCMIKEN, D.F. Muscle-fiber types and horse performance. **Equine Practice.**, 8: 6 14. 1986.
- [55] MORA, G.; ISLAS, A.; QUEZADA, M.; LÓPEZ-RIVERO, J.L.; PÉREZ, R.; AEDO, V. Muscle biopsy in the Gluteus Medius of Draft horses. **Agro-Ciencia**, 11: 201-204. 1995.
- [56] NIMMO, M.A.; SNOW, D.H. Changes in muscle glycogen, lactate and pyruvate concentrations in the Thoroughbred horses following maximal exercise. In: **Equine Exercise Physiology.** Eds.: D.H. Snow, S.G.B. Persson and R.J. Rose. Granta Editions, Cambridge: 237-244. 1983.
- [57] NORMAN, G.R.; STRIENER, D.L. Regresión Simple y Correlación; Comparar dos grupos, El Test de la t. En: **Bioestadística.** McGraw-Hill. Interamericana, Madrid-España: 58-62; 100-128. 1996.
- [58] NOVIKOFF, A.B.; SHINE, W.; DRUCKER, J. Mitochondrial localisation of oxidation enzymes: Stain results with two tetrazolium salts. **J. Biophys. Biochem.** 9: 47-61. 1961.
- [59] PÉARSE, A.G.E. **Histochemistry-Theoretical and Applied. Appendix, 9.** Little Brown, Boston: 32. 1961.
- [60] RAUPSEPP, M.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A. Skeletal muscle characteristics in Standardbred trotters in relation to different levels of physical activity during early age. **Clinical Physiol., Biochemistry of Exercise.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, NY Vol. 5, Suppl. 4: 197. 1985.
- [61] RIVERO, J.L.L.; TALMADGE, R.J.; EDGERTON, V.R. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the influence of training. **Anat. Rec.**, 246: 195-207. 1996.
- [62] RIVERO, J.L.L.; RUZ, M.C.; SERRANO, A.L.; DIZ, M.A. Effect of 3 month endurance training programme on skeletal muscle histochemistry in Andalusian, Arabian and Anglo-Arabian horses. **Equine Vet. J.**, 27: 51-59. 1995.
- [63] RONÉUS, N.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B. Skeletal muscle characteristic and metabolic response to exercise in young Standardbreds. **Am. J. Vet. Res.**, 58: 167-170. 1997.
- [64] RONÉUS, M.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A.; PERSSON, S.G.B. Skeletal muscle characteristics in

- young trained and untrained Standardbred trotters. **Equine Vet. J.**, 24: 292-294. 1992.
- [65] RONÉUS, M.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A.; PERSSON, S. A field study of circulatory response and muscle characteristics in young Thoroughbreds. In: **Equine Exercise Physiology 2**. Eds.: J.R. Gillespie and N.E. Robinson, ICEEP Publications, Davis, California: 376-383.1987.
- [66] SAHLIN, K.; HARRIS, R.C.; NYLIND, B.; HUTMAN, E. Lactate content and pH in muscle samples obtained after dynamic exercise. **Plüegers Arch.**, 367: 143-149. 1976.
- [67] SALMONS, S.; HENRIKSSON, J. The adaptative response of skeletal muscle to increased use. **Muscle Nerve**, 4: 94-105. 1981.
- [68] SCHANTZ, P.G. Plasticity of human skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.**, (Suppl. 558): 1-62. 1986.
- [69] SISSON, S.; GROSSMAN, J.D. *Miología de los equinos* En: **Anatomía de los animales domésticos (Tomo I)**. 5ª edición, Editores: C.E. Rosenbaum, N.G. Ghoshal and D. Hillman, Salvat Editores S.A. España: 423-507. 1985.
- [70] SNOW, D. Muscle fatigue-short and long distance exercise. **Proceedings of the International Conference for Equine Sports Medicine**, August, 11-13 San Diego California (USA): 23-24. 1986.
- [71] SNOW, D.H.; HARRIS, R.C. Limitations to maximal performance in the racing Thoroughbreds. In: **Biochemistry of Exercise**. VI International Serie on Sports Sciences.. Edited by B. Saltin. Vol. 16: 447-454. 1986.
- [72] SNOW, D.H.; HARRIS, R.C.; GASH, S. Metabolic response of equine muscle to intermittent maximal exercise. **J. Appl. Physiol.**, 58: 1689-1697. 1985.
- [73] SNOW, D.H.; MANSON, D.K.; RICKETTS, S.W.; DOUGLAS, T.A. Post-race blood biochemistry in Thoroughbreds. In: **Equine Exercise Physiology**. Eds.: D.H. Snow, S.G.B. Persson and R.J. Rose. Granta Editions. Cambridge: 389-399. 1983.
- [74] SNOW, D.H. The horse and dog, elite athletes- why and how. **Proc. Nutrition Soc.**, 44: 267-272. 1985.
- [75] SNOW, D.H. Skeletal muscle adaptations: A review. In: **Equine Exercise Physiology**. Eds.: D.H. Snow, S.G.B. Persson and R. J. Rose. Granta Editions. Cambridge: 160-183.1983.
- [76] SNOW, D.H.; BAXTER, P.; ROSE, R.J. Muscle fibre types composition and glycogen depletion in horses competing in an endurance ride. **Vet. Rec.**, 108: 374-378. 1981.
- [77] SNOW, D.H.; GUY, P.S. The effect of training and de-training on several enzymes in horse skeletal muscle. **Arch. Inter. Physiol. Biochem.**, 87: 87-93. 1979.
- [78] SNOW, D.H.; MACKENZIE, G. Some metabolic effects of maximal exercise in the horse and adaptations with training. **Equine Vet J.**, 9: 134-140.1977.
- [79] SOZA, M.; KARPATI, G. Skeletal muscle endurance: The effect of increased availability of endogenous long-chain fatty acid fuel. **Exp. Neurol.**, 91: 449-462. 1986.
- [80] STRAUB, R.; DETTWILER, M.; HOPPELER, H.; CLAASEN, H. The use of morphometry and enzyme activity measurements in skeletal muscles for the assessment of the working capacity of horses. In: **Equine Exercise Physiology**. Eds.: D.H. Snow, S.G.B. Persson and R.J. Rose, Granta Editions. Cambridge: 193-210. 1983.
- [81] STRAUB, R.; HOWLAND, H.; GERBER, H.; DIEHL, M.; PAULI, B. Structural and enzyme study on trained and untrained horse skeletal muscles. **Schweizer Arch. Tierheilk.**, 117: 453-457. 1975.
- [82] SUCRE, L.; FINOL, H.J.; PÉREZ, R.; PACHECO, I. Análisis ultraestructural del Músculo Gluteus Medius del caballo de tiro mestizo chileno, sometido a trabajo de labranza posterior a un período prolongado de inactividad. **Revista Científica**, Vol. IX, (3), 205-214. 1999.
- [83] TAYLOR, A.W.; BRASSARD, L. Skeletal muscle fiber distribution and trained and stalled Standardbred horses. **Can J. Anim. Sci.**, 61: 601-606. 1981.
- [84] VALBERG, S. Performance profiling-muscle biopsy **Proceedings of the International Conference for Equine Sports Medicine**. August, 11-13, San Diego, California: 109-111. 1986.
- [85] VALBERG, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDHOLM, A.; PERSSON, S. Energy metabolism in relation to skeletal muscle fibres properties during treadmill exercise. **Equine Vet. J.**, 17: 439-444. 1985.
- [86] WILKIE, D.R. Muscular fatigue: Effects of hydrogen ions and inorganic phosphate. **Federation Proc.**, 45: 2921-2923. 1986.
- [87] WILSON, R.G.; THORNTON, J.R.; INGLIS, S.; AINSCOW, J. Skeletal muscle adaptation in race horses following high intensity interval training. In: **Equine Exercise Physiology 2**. Eds.: J.R. Gillespie and N.E. Robinson ICEEP Publications, Davis, California: 367-375. 1987.