



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION  
Y DE LA SALUD ANIMAL

EFFECTO DELCARAZOLOL EN EL MUSCULO ESQUELETICO  
DEL CABALLO DE DEPORTE

TESIS PARA OBTENER EL GRADO  
DE MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTADA

MOISÉS EDUARDO VALDERRAMA SABORÍO.

**TUTOR.** EUGENIO QUIROZ ROTHE.  
COMITETUTORAL. LUIS OCAMPO CAMBEROS.  
CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR



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 Alice por su apoyo y ayuda*

*A mis padres que me han guiado y apoyado*

*A mi familia que me han dado su apoyo*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios que me ha sustentado cada uno de mis días*

*A la facultad de medicina veterinaria y zootecnia a sus académicos.*

*A mi asesor Eugenio Quiroz por su apoyo, tiempo a lo largo del desarrollo de este trabajo.*

*A los miembros del comité tutorial Luis Ocampo Camberos y a Carlos Garcia Tovar.*

*A Sandra del Castillo por facilitarnos los caballos para este experimento por su apoyo y comprensión.*

*Al laboratorio Schütze Seegen S.A de C.V y al Dr. Jorge Luengo Creel por el apoyo al proporcionar los medicamentos utilizados para las pruebas.*

*Al laboratorio de histología de la Facultad de Medicina UNAM. Y en especial a la técnica Verónica y la técnica Judith por su ayuda y guía en el corte y realización de técnicas histoquímicas e histológicas*

*A cada uno de los médicos que me han apoyado en mi formación al enseñarme, permitirme practicar y darme su confianza a través de todo este tiempo*

*Al departamento de fisiología y farmacología por su confianza*

*A cada persona que ha influido a lo largo de mi vida para lograr cada una de mis metas*

## CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INTRODUCCION	1
<b>I. BASES MORFOLÓGICAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO</b>	2
<b>II. CLASIFICACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EQUINO</b>	3
<b>III. METABOLISMO MUSCULAR</b>	7
<b>IV. BIOPSIAS MUSCULARES</b>	9
<b>V. BASES DEL ANÁLISIS DE IMÁGENES</b>	11
<b>VI. RECEPTORES ADRENÉRGICOS.</b>	13
<b>VII. CARAZOLOL</b>	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	40
ANEXOS	41
BIBLIOGRAFÍA	51

## Resumen

El interés por estudiar el músculo esquelético del caballo se ha orientado hacia la comprensión del proceso de adaptación de este tejido frente a estímulos: fisiológicos, patológicos y farmacológicos. La síntesis y utilización de diferentes fármacos bloqueadores de receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$  ha permitido controlar diferentes funciones biológicas. La actividad de los receptores adrenérgicos  $\beta_3$  se relacionan con el metabolismo lípidico. Estos producen, atenuación de la hiperlipemia, incremento gradual de la masa muscular y disminución del recambio proteico. Sin embargo, no se conocen datos sobre el efecto de fármacos bloqueadores de los adrenoreceptores  $\beta_3$ , (p.e: carazolol) en el metabolismo intermediario del músculo esquelético de caballos. Para determinar el efecto del carazolol sobre las características contráctiles (velocidad máxima de contracción), metabólicas (capacidad oxidativa, capacidad glucolítica, contenido glucógeno) y morfológicas (área transversal fibrilar, densidad de mionúcleos y capilares) de las fibras músculo esqueléticas en caballos sedentarios y de deporte. Se utilizaron dos grupos de caballos adultos (5-10 años). Divididos en un grupo sedentarios (SED n=10) formado por 2 subgrupos, sin tratamiento (n=5) y (n= 5) tratado con carazolol 10 mg/100kg durante 8 días. El de deporte (DE n=10) sin tratamiento (n=5), y otro con 10 mg/100kg de carazolol durante 8 días (n=5). De ambos grupos se obtuvieron biopsias musculares mediante aguja percutánea antes del tratamiento (d0) y a los 9 días post tratamiento. Y se analizaron utilizando una batería de tinciones histológicas e histoquímicas. Se encontró un cambio metabólico y estructural, potencializando su efecto en el grupo de caballos que realiza ejercicio, aumentando la capacidad oxidativa de las fibras musculares en los caballos sedentarios y una inhibición de la glucolisis.

## **Abstract.**

The interest in studying the skeletal muscle of the horse has been oriented to the comprehension of the reaction from this tissue to stimulation: physiologic, pathologic and pharmacologic. The synthesis and use of drugs that block the adrenergic receptors  $\alpha$  and  $\beta$  has made possible to control different biological functions. The adrenergic receptors  $\beta$  3's activity is related with the lipid metabolism. They produce attenuation of the hiperlipedemia, gradual increment of the muscle mass and the decrease of the protein change. However, there are no known facts from the effect produced by the drugs that block adrenoreceptors  $\beta$ 3 (e.g. carazolol) in the horse's intermediary skeletal muscle. To determine the effect from the carazolol over the contractile characteristics (maximum contraction speed), metabolic (oxidative capacity, glycolytic capacity, glycogen content) and morphologic (fibrillar cross-sectional area, myonuclei and capillary density) of the skeletal muscle fibers from sedentary horses and racing horses. Two adult horses (5-10 years) groups were used. The first group had the sedentary horses (SED n=10) divided in 2 subgroups, the first one without treatment (n=5) and the other one (n=5) treated with carazolol 10mg/100kg during 8 days. From both groups muscular biopsies were obtained. They were taken with a percutaneous needle before the treatment (d0) and 9 days after the treatment. And they were analyzed with a histological and histochemical stains battery. A metabolic and a structural change was found improving his effect in the horses that made exercise, increasing the muscular fibers oxidative capacity in the sedentary horses and one glycolysis inhibition.

## INTRODUCCIÓN

Desde hace 35 años el estudio del músculo esquelético, ha permitido comprender la relación estratégica de este tejido, con el rendimiento deportivo del caballo. Desde entonces se ha analizado a nivel celular y molecular la diversidad de fibras musculares y su adaptación frente a estímulos fisiológicos (ejercicio y entrenamiento), patológicos (miopatías miogénicas y neuromusculares) y farmacológicas (p.e: uso anabólicos) (Persson et al., 1991). En una primera parte se revisan en este trabajo las características morfológicas, perfil metabólico y contráctil de las fibras musculares del caballo utilizando biopsias de este tejido (Andrews 1997) obtenidas con aguja percutánea (Bergstrom, 1975, Lidner et al., 2002). El uso combinado de técnicas de evaluación celular y molecular de las mismas y su posterior análisis digitalizado permite lograr una correcta tipificación miofibrilar y los mecanismos de coordinación y adaptación del fenotipo muscular en animales sedentarios y deportistas (Andersen et al., 1997, Barrey et al., 1999). La capacidad de adaptación del músculo frente al esfuerzo físico se basa en una respuesta plástica estructural y funcional relacionada a la intensidad, duración y frecuencia del mismo (Williams y Neuffer 1996, Hyypä et al., 1997). Se describen en continuación los aspectos generales de los fármacos beta bloqueadores y las principales características del carazolol. El efecto de este fármaco en el músculo equino se desconoce y representa el objetivo general de este trabajo.



## **I. BASES MORFOLÓGICAS DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO**

El estudio de diferentes especies animales ha mostrado que desde el más simple hasta el más complejo, tiene la capacidad de movimiento, ya sea para buscar alimento y medio ambiente favorable para sobrevivir (Alberts et al., 2008). Entre más complejos son los organismos, se empiezan a conformar tejidos especializados para el movimiento (p.e: músculo estriado esquelético). Mientras que el tamaño del músculo es importante para delimitar la fuerza de contracción, el arreglo estructural de la sarcomera es todavía más importante para generar esa fuerza de contracción (Sacks and Roy, 1982). 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 et al., 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 neurovascular 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 sarcoendoplásmico y la movilización de calcio (Pette, 1980; Berchtold et al., 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. (Huxley, 1971; Pette, 1980; Alberts et al., 1983). Las miofibrillas se localizan en el citoplasma fibrilar (sarcoplasma), éste 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. 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 Reggiani, 1996; Talmadge et al., 1993; Rivero et al., 1999).

## **II. CLASIFICACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EQUINO**

La tipificación del músculo esquelético en los caballos se da principalmente mediante el análisis histológico, histoquímico, inmunohistoquímico y electroforético. Mediante combinación de análisis se ha encontrado que existen 5 tipos celulares en el músculo esquelético de los caballos, las cuales se han caracterizado por la tipificación de las cadenas pesadas de miosina (MHC) y se le asignó la siguiente nomenclatura I, I+IIA, IIA, IIAX y IIX (Quiroz et al., 2001).

Las fibras tipo I tienen un isoforma de cadenas pesadas de miosina que hidrolizan el ATP de forma lenta, generando un ciclo de los puentes cruzados de forma lenta, junto con una gran cantidad de capilares y una alta capacidad oxidativa. Con una baja capacidad glucolítica y un contenido de glucógeno relativamente bajo, dándole una alta eficiencia productiva en movimientos repetitivos lentos y de contracciones isométricas, pero sin una generación de poder significativa.

En contraste las fibras tipo II, tienen unas cadenas de miosina con isoformas que generan ciclos de los puentes cruzados de manera rápida y como consecuencia una gran fuerza y velocidad en las contracciones. Dentro del grupo de las fibras tipo II, se encuentran las fibras IIX y estas fibras generan máxima velocidad en corto tiempo, que son tres veces más rápidas que las fibras IIA (Rome et al., 1990; Rivero et al., 1999). Las fibras IIX están adaptadas para generar mucha fuerza por un corto tiempo, porque éstas tienen una capacidad oxidativa muy baja y una disposición de oxígeno muy limitada, esto se ve reflejado por unos puentes cruzados muy grandes y una baja capilaridad. Las fibras tipo IIA

en cambio, tienen una alta capilaridad y una gran cantidad de mitocondrias, generando un alto metabolismo oxidativo y glicolítico y teniendo éstas la capacidad de generar un movimiento sostenido y con fuerza, por un tiempo más prolongado que las fibras IIX .

Existen fibras híbridas que se conocen como fibras IIX que tienen propiedades metabólicas e histoquímicas intermedias entre las fibras IIA y las IIX (Quiroz et al., 2001). Además de la clasificación por la isoforma de las cadenas de miosina existen otros aspectos que ayudan a mantener las características funcionales de los tipos celulares de los músculos, como son la capacidad de síntesis proteica (Booth et al., 1996), la capacidad de generar fosfatos de alta energía, la sensibilidad al  $Ca^{+}$  (Mlekoday et al., 2001) y la presencia de carnitina y taurina (Dunnett et al., 1992).

Cada uno de estos tipos celulares se caracterizan por tener una actividad metabólica diferente y son estas capacidades metabólicas, lo que le permiten trabajar bajo diferentes tipos de ejercicio y es por esto que se especializan y se reclutan mediante procesos plásticos a formar una mayor proporción de las fibras musculares, dependiendo del ejercicio o su actividad física generando cambios metabólicos y estructurales.

La actividad enzimática del glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (GPDH), ha sido utilizada como un marcador indirecto del potencial glucolítico de las fibras musculares, ya que la GPDH, se correlaciona con otras enzimas de la glucólisis (Miyata et al., 1999). La GPDH está involucrada en las vías glucolíticas, interactuando con la transferencia de NADH de la glucólisis en el citosol en FADH en las mitocondrias del músculo esquelético (Quiroz et al., 2001).

El metabolismo de la fibra se determinó al evaluar la actividad de la succinato deshidrogenasa (SDH), enzima que se localiza en la membrana interna mitocondrial y que se usa como marcador de la capacidad oxidativa, ya que se relaciona con la cantidad total de mitocondrias. La tinción se llevará a cabo según protocolo descrito por Blanco *et al.*, (1988).

Las fibras identificadas de acuerdo a su reacción a mATP-asa y SDH se clasificaron según Peter *et al.* (1972), en fibras oxidativas lentas (SO, fibras que reaccionan fuertemente a

mATP-asa después de pre incubación ácida y actividad SDH), fibras glucolíticas oxidativas rápidas (FOG, fibras que no reaccionan a mATP-asa, después de pre incubación ácida y que reaccionan con intensidad moderada a SDH) y fibras glucolíticas rápidas (FG, fibras que no reaccionan a mATP-asa, después de pre incubación ácida y que reaccionan con intensidad baja a SDH).

Cuando los músculos no pueden realizar su función sin reacciones bioquímicas y fuentes de energía para producir altos niveles de energía en forma de ATP, es necesario la contracción de las fibras de miosina y la activación de los canales dependientes de energía para tener un funcionamiento adecuado durante la actividad física (cuadro 1)

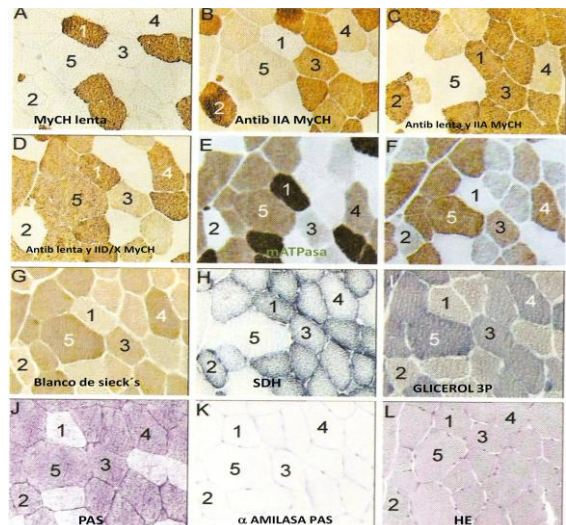


Figura 1. Cortes de músculo glúteo medio con tinciones inmunistoquímica, histoquímica e histológica, para su clasificación y análisis (Quiroz et al., 2001).

Características	Tipos de fibras			
	I	IIA	IIB	
<b>A) HISTOLÓGICAS</b>				
Tamaño	Pequeño	Intermedio	Grande	Barlow <i>et al.</i> , 1984
Color	Rojo	Intermedio	Blanco	Schuber 1971 /72
Densidad capilar	Alta	Intermedio	Bajo	Snow 1983a
Mitocondrias	Numerosas	Numerosas periféricas	Escasas	Hoppeler <i>et al.</i> , 1983
Densidad volumen mitocondrial	5.6 %	6.7 %	0.7 % - 3.25 %	Hoppeler <i>et al.</i> , 1983
<b>B) FISIOLÓGICAS</b>				
Velocidad de contracción	Lenta	Rapida		Howald 1982
Tiempo de contracción	99 – 140 ms	40 – 88 ms		Garnett <i>et al</i> 1979
Veloc. de relajación	Lenta	Rapida		Wiles <i>et al</i> 1979
Maxima tensión	12 g	25 g		Garnett <i>et al</i> 1979
Veloc. Conducción de membrana.	2.5 m/s	5.4 m/s		Howald 1982
Elasticidad	Alta	Baja		Barlow <i>et al</i> 1984
Fuerza/intensidad	Lento des. Baja int.	Rapido desarrollo		Barlow <i>et al</i> 1984
Función	Aplomos y resistencia	Propulsión y velocidad		Aberle <i>et al</i> 1976
<b>C) METABÓLICAS</b>				
Cap. Oxidativa	Alta	Intermedia	Baja	Snow 1983
Cap. Glucolítica	Baja	Intermedia	Alta	Valberg <i>et al</i> 1985
Cont. Glucógeno	Inermedio	Alta	Alta	Andreus/Spurgeon 19985
Cont. M- ATPasa	Baja	Alta	Alta	Rose 1985
Ac. Glucógeno sintet	Baja	Alta	Alta	Snow <i>et al</i> 1982b
Act. LDH	Baja	Alta	Alta	Valberg/Essén-G 1985
Act. GPDH	Baja	Baja	Alta	V.D.Hoven <i>et al</i> 1985
Act. CS	Alta	Alta	Baja	Valberg/Essén-G 1985
<b>D) HISTOQUÍMICAS</b>				
Act. NADH – TR	(Alta)	Intermedia	(Baja)	Essén <i>et al.</i> , 1980
Act. SDH	(Alta)	Intermedia	(Baja)	Snow/Guy 1980

Cuadro 1: Cuadro resumido de López Rivero, 1988 con las principales características del músculo esquelético.

### III. METABOLISMO MUSCULAR

Metabolismo anaeróbico.

Estas vías metabólicas se pueden dividir en dos mecanismos diferentes, el primer sistema incluye la transformación de la energía en fosfatos, incluyendo la actividad de sistemas enzimáticos como la creatinina quinasa, la adenil quinasa y el AMP deaminasa. La segunda vía anaeróbica está formada por la glucólisis, la cual requiere de glucosa, ya sea obtenida de la circulación o del glucógeno almacenado en el músculo para convertirlo en glucógeno-1- fosfato mediante glucogenolisis, y después convertirlo en glucosa-6- fosfato como sustrato, y por medio de la glucólisis convertirlo en 2 moléculas de piruvato y éstas son transformadas en lactato generando 2 moléculas de ATP

Vía metabólica aeróbica.

En esta vía involucra a las mitocondrias para poder realizar la beta oxidación de ácidos grasos libres, el ciclo de los triacilglicéridos y la fosforilación oxidativa y éstas se combinan para producir ATP de forma aeróbica (Clark 1975).

Las formas en las que las células musculares pueden captar su fuente de energía para procesarlas y utilizarlas son:

El mecanismo por el que los carbohidratos pueden atravesar de la circulación al citoplasma, durante el ejercicio, éste se da con la ayuda de una gran cantidad de proteínas transportadoras de glucosa, que están en la superficie de las membranas y se conoce como GLUT 1 y GLUT4. El GLUT 1 se encuentra en el sarcolema y éste supe la cantidad de glucosa par el funcionamiento basal, en el caso del GLUT-4 en el sarcolema forma vesículas, la cual tiene la ventaja de que ésta se activa bajo el estímulo de niveles elevados de calcio y AMP generados bajo la contracción muscular intensa o bajo el estímulo de la insulina y otras enzimas metabólicas como el óxido nítrico (Figura 2) (Rose et al., 2005)

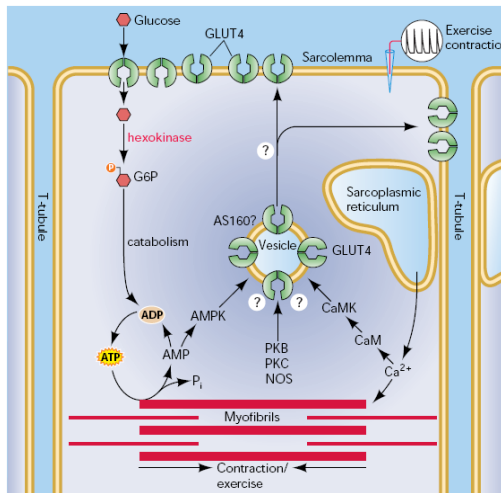


Figura 2. Esquema de los mecanismos de activación del GLUT-4 (Rose et al., 2005).

En el caso de los lípidos tanto la movilización como el transporte de los ácidos grasos libres de las reservas del tejido adiposo como el que se encuentra dentro del músculo esquelético, se da por medio de la hormona sensible a lipasas (HSL), la cual promueve la liberación de los ácidos grasos libres de las reservas de triacil glicerol. El transporte de los ácidos grasos tanto al interior como al exterior de los adipocitos, es a través del transportador CD36. Una vez que los ácidos grasos se encuentran en la circulación, estos se unen a la albúmina, que se va a unir a la membrana del músculo, y los ácidos grasos se van a transportar por medio de la proteína CD36 o a una proteína transportadora de ácidos grasos, una vez en el citoplasma muscular se unen a una proteína formadora de ácidos grasos y se convierten en ácidos grasos CoA, por la acción de acetil-CoA sintetasa y potencializa a la proteína transportadora de ácidos grasos, los ácidos grasos CoA se unen con la proteína ensambladora de acetil CoA y se convierten en ácidos grasos-carnitina, por medio de la carnitina palmitoiltransferasa I. Los ácidos grasos carnitina se transportan a la mitocondria, por la carnitina aciltransferasa y lo regresan a ácidos grasos CoA, en la membrana mitocondrial y entra a la vía oxidativa (McClelland 2004) (Figura 3).

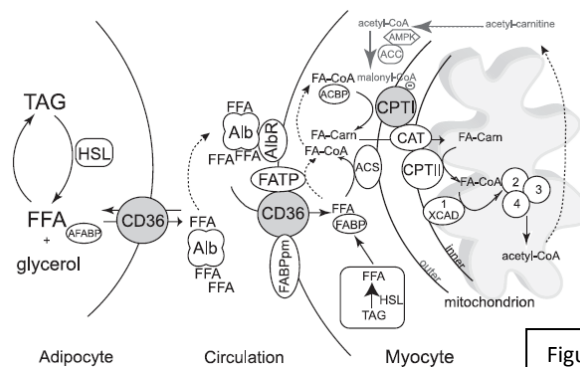


Figura 3. Vías metabólicas de los ácidos grasos libres cuadro de McClelland 2004.

#### IV. BIOPSIAS MUSCULARES

La obtención de las biopsias musculares se realiza de manera quirúrgica, o utilizando la aguja de biopsia percutánea de Bergstrom inmediatamente al sacrificar al animal. La aguja percutánea representa a nuestro parecer la opción más inocua para el animal y práctica para obtener una muestra de cualquier músculo permitiendo que el animal continúe su entrenamiento. Una vez obtenidas las muestras se debe proceder a su conservación. Para este fin se pueden utilizar varias opciones, ya sea la fijación 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 la relajación de las fibras, y se recubren sobre una base se corcho o el émbolo 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 interfibrilar 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 pre incubaciones ácidas y alcalinas a distintos pH (Brooke y Kaiser 1973), succinil deshidrogenada (SDH), glicerol fosfato deshidrogenada, ácido periódico de Schiff (PAS),  $\alpha$  PAS amilasa. Los protocolos y estas técnicas se encuentran amplia mente descritos. 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 mATPasa (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 Samaha1970, 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 pre incubación, es definida como aquella que proporciona el mejor contraste para la diferenciación de los tres tipos principales de fibras (López Rivero, 1988), identificando por mATPasa alcalina fibras alcalino lábiles (tipo I) y alcalino estables (tipo II) (López Rivero,

1988). Con la técnica de mATPasa 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.

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 sólo 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 mATPasa, 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 (1969), permite diferenciar diferentes tonalidades de intensidad reactiva.

## **V. BASES DEL ANÁLISIS DE IMÁGENES**

La evaluación de muestras histológicas se ha basado en el análisis visual. La correcta interpretación de las imágenes depende de la experiencia, el 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 et al., 1988; Romano et al., 1996; Userpater et al., 2003). El análisis de imagen incluye los procedimientos involucrados en la obtención, conservación, manipulación, optimización y estudio de una imagen (p.e: histologica), a fin de obtener información objetiva de la misma (Gundersen et al., 1988; Weibel, 1989; Userpater et al., 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 et al., 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, el número de células por volumen (Weibel, 1989; Userpater et al., 2003). Estos parámetros morfológicos se correlacionan directamente con la función tisular (Weibel, 1989; Userpater et al., 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 et al., 2003).

La bibliografía reporta la correlación entre inmunocomplejos y la densidad óptica de un objeto (Wells, 1993; Portiansky et al.). 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 et al,1993). Las secciones del tejido que vayan a analizarse deben estar libres de artefactos y en el caso del tejido muscular la sección debe incluir al menos 50 fibras que puedan ser correctamente identificadas. Las células deben numerarse aleatoriamente pero siempre deben ser las mismas (en cada tinción analizada) y a esta sección se le llama también mapa o máscara fibrilar. Se debe determinar un valor de densidad óptica como referencia, es decir; se calcula un valor blanco en cada tinción, debe ser considerado como valor mínimo en cada muestra analizada. Se debe establecer también la medida del área o estructura a analizar y poder determinar posteriormente la densidad de diferentes organelos (Wells et al, 1993; Weibel, 1989).

## VI. RECEPTORES ADRENÉRGICOS.

Una de las áreas de mayor interés en la fisiología y farmacología veterinaria, ha sido el estudio de los efectos de distintos fármacos en el fenotipo de las fibras musculares del músculo esquelético de diferentes especies animales. La clasificación de los receptores adrenérgicos ( $\alpha$  y  $\beta$ ), hecha por Ahlquist en 1948, ha permitido el estudio de varios medicamentos agonistas y/o antagonistas de estos receptores. Los receptores adrenérgicos son glucoproteínas integrales de la membrana celular (figura 4), que se activan primeramente por el isoproterenol, después por la adrenalina y por último por la noradrenalina. Existen dos tipos de los receptores adrenérgicos  $\alpha$ : los  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ; de los receptores adrenérgicos  $\beta$ , se clasifican en  $\beta_1$  (cardioselectivos),  $\beta_2$  (en el músculo liso) y  $\beta_3$  (en los adipocitos) principalmente y se relacionan estos últimos con el metabolismo lipídico intracelular (Alexander et al., 2007).

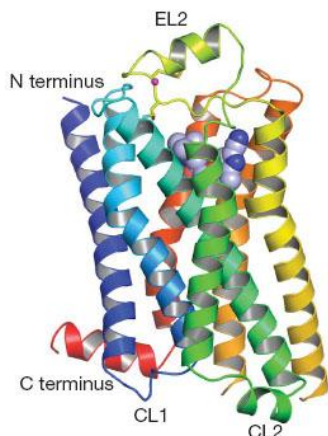


FIGURA 4. Modelo de la estructura de un receptor beta 1 adrenérgico.

La activación de los receptores  $\beta_3$  produce una estimulación de las lipasas específicas (p.e: triglicérido lipasa), que induce lipólisis y eleva la lipemia. Dicha activación de los receptores  $\beta_3$ , estimulan a las proteínas  $G_s$ , que incrementan la concentración de AMPc, activando a la proteína cinasa  $A_1$ , e induce la fosforilación de diversas proteínas que estimulan o inhiben distintas funciones celulares (Mersmann, 1998; Strosberg, 1997). Las proteínas  $G_{i/o}$ , estimulan la  $ERK_{1/2}$  y PKB, estos activan vías de señalización asociadas principalmente con factores de crecimiento y con insulina (figura 5). Las alteraciones en

receptores beta e insulina se asocian con obesidad y diabetes insulina resistente (Gerhardt et al., 1999).

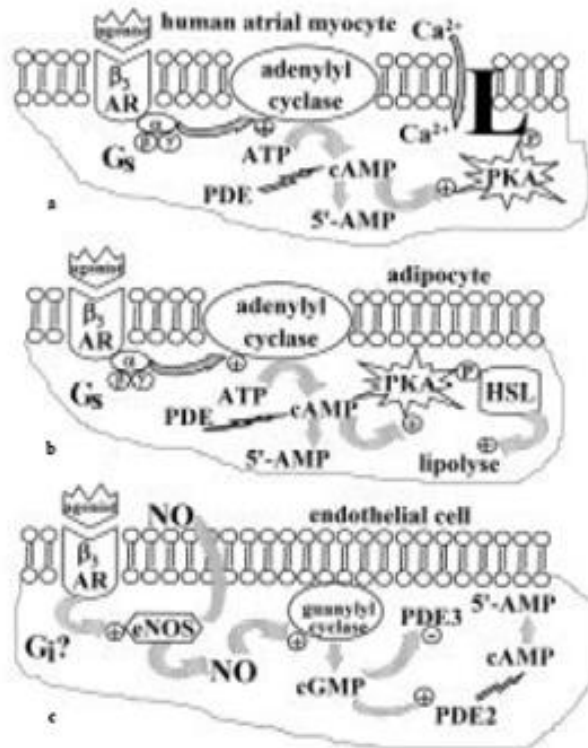


Figura 5. Función de los receptores adrenérgicos beta 3 en miocitos atriales en humanos (A) y adipocitos (B) los receptores están unidos a proteínas Gs y estimulan los transportadores de calcio o lipólisis respectivamente. (C) En las células endoteliales los receptores beta 3 al estar unidos a óxido nítrico endotelial sintetasa (eNOS) tiene un efecto inividor de las proteínas Gi y estimulan la produccion de óxido nítrico, PKA-cAMP dependiente de la proteínKinasa; hidrolizando cAMP permitiendo la apertura de canales de calcio. (straipsniai, 2004)

La administración de agonistas β<sub>3</sub> adrenérgicos inhiben la proteólisis (Navegantes et al., 2006) y estimulan la beta oxidación (Board et al., 2000), existe evidencia de que también estimulan la bomba de Na y K en corazón de ratón, mediante la estimulación de la isoforma endotelial de óxido nítrico sintetasa (Barouch et al., 2002) y la estimulación de oxido nítrico, activa la guanilato ciclasa soluble, permitiendo que aumente cGMP y la activación de cGMP dependiente de proteína cinasa (Kobzik et al., 1994); sin embargo esto no se pudo demostrar en músculo esquelético de la rata ( Murphy et al., 2006).

Los receptores adrenérgicos  $\beta_3$  son considerados atípicos porque o no son bloqueados, o lo son muy escasamente, por bloqueadores beta clásicos. Los bloqueadores beta actúan como antagonistas competitivos de los estimulantes beta, por lo que disminuyen o inhiben los efectos de la estimulación simpática directa (a los nervios simpáticos) o refleja (por administración de fármacos beta estimulantes). Por lo que uno de los efectos más importantes de los fármacos bloqueadores beta es del intervenir y evitar el efecto cronotrópico e inotrópico positivo producido por las catecolaminas o por otros medicamentos (Mersmann, 1998). Los fármacos beta bloqueadores atenúan la hiperlipemia, observándose tras su administración una moderada elevación de los triglicéridos y disminución de lipoproteínas de alta densidad (Pietri-Rouxel et al., 1995).

La distribución de los receptores  $\beta_3$ , expresados en la membrana extracelular de células de humanos y en tejidos como vesícula biliar, próstata, colon, músculo esquelético, corazón y tejido adiposo. Además se detectaron señales de mRNA en músculo esquelético, en corazón y en tejido adiposo (Gauthier et al., 1996; Chamberlain et al., 1999).

Existen trabajos que mencionan que al activar los receptores  $\beta_3$  hay un aumento en el consumo de oxígeno (Miller et al., 1999) y un aumento en el metabolismo, generan un aumento en los niveles de glicerol. Esta activación genera una pérdida de peso del 15% al estimularse la oxidación de lípidos, estos reducen la ingesta de alimento (Durrant et al., 1980; Fisher et al., 1998).

Los efectos terapéuticos de los beta-bloqueadores se deben principalmente a una o varias de las siguientes acciones fisiológicas: reducción del rendimiento cardíaco, disminución de la liberación de renina, disminución general de la actividad del sistema nervioso simpático (tono simpático). Los beta bloqueadores tienen una acción ansiolítica, principalmente cuando la génesis de la ansiedad se relaciona con un exceso de actividad simpática (Emery et al., 1984). La administración oral de estos fármacos promueve el crecimiento muscular esquelético, al tiempo que reducen la disposición de grasa corporal (Emery et al., 1984).

Este efecto se ha observado en bovinos, ovinos, porcinos, aves de corral y peces (no se ha descrito en équidos). 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 proteínas, o en una combinación de ambos (Mersmann, 1998; Molones et al., 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, inhibidor endógeno de las proteasas calpainas (Killeffer y Koohmaraie, 1994). La mayor movilización de aminoácidos hacia el interior del músculo y de ácidos grasos no esterificados, utilizados como fuente de energía a partir del músculo, promueve la deposición gradual de las proteínas y la hipertrofia muscular (Byrem et al., 1998).



## VII. CARAZOLOL

El carazolol es un fármaco bloqueador selectivo de los adrenoreceptores postsinápticos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  antagonista y un efecto  $\beta_3$  adrenergico agonista. Tiene un efecto directo sobre las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), de la adenilciclase y del AMPc (Figura 6)(Pietri-Rouxel et al., 1995, Morris et al.,1978). Se ha utilizado por su efecto hipotensor (Keul et al., 1985), ya que el estrés crónico produce una liberación excesiva de adrenalina y noradrenalina, lo que produce entre otros efectos, un incremento en el metabolismo energético (p.e: del glucógeno hepático y muscular y la movilización de ácidos grasos) (Menjean et al., 1995; Costil et al., 1983;). El carazolol se ha utilizado como agente tranquilizador en animales y en el ser humano, pero 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 inhibir la reacción al estímulo fisiológico a nivel del sistema nervioso central (actividad simpaticolítica) (Menjean et al., 1995; Innis et al., 1979). La acción de este fármaco a nivel del sistema nervioso autónomo-simpático, incluye disminución de: taquicardia, hipertermia, pérdida de peso y previene la acidosis metabólica. También reduce la glucólisis y previene la formación de lactato. El carazolol está contraindicado en animales con insuficiencia cardiaca, bradicardia, broncopatía obstructiva y durante la gestación. Fuera de lo dicho, no existen restricciones ni de edad ni sexo para su uso (Gregory et al., 1982).

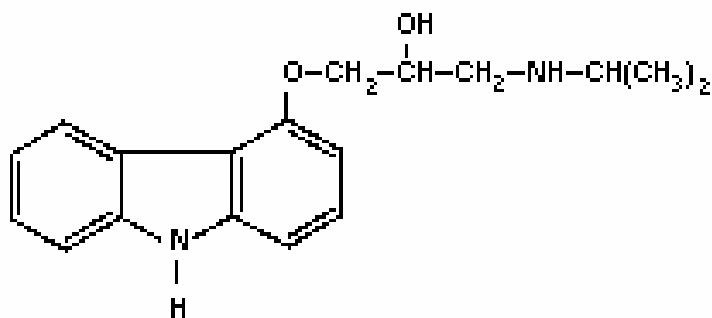


Figura 6. Formula estructural del carazolol (Morris et al., 1978).

Algunas de las aplicaciones terapéuticas son en medicina veterinaria y humana, como ejemplo se ha utilizado en bovinos como un importante fármaco para acelerar la eliminación de las placentas (16 hrs a 7 hrs), reduciendo la cantidad de animales con retención de placenta de un 55% a un 14%. Esto también se encontró en cerdos (Holtz et al., 1990). Se ha utilizado principalmente en cerdos antes del transporte para reducir el estrés y de esta forma reducir la merma de la carne, por aumento en el metabolismo por el efecto de las catecolaminas así como las muertes generadas por las taquicardias (Delahaut et al., 2004). Se han usado una gran cantidad de beta bloqueadores para tratar enfermedades cardiovasculares y de hipertensión (Manalan et al., 1981).

La administración del carazolol por vía I. M., permite una absorción rápida y un efecto evidente cerca de 10 a 12 horas. La principal vía de eliminación es por vía urinaria (85-90%, primeras 24 hrs) el resto por vía hepática y fecal. La dosis por vía intramuscular en bovinos y porcinos es de 1 mg /100 kg. Con la administración por vía oral, se logra una absorción en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la biodisponibilidad oral es tan sólo de aproximadamente el 10 %, por lo que se requieren 10 veces más dosis por vía oral para lograr el mismo efecto. El tiempo de retiro en animales productores de carne es tan sólo de 24 hrs. La ingesta diaria admisible (ADI por las siglas en inglés) es de 1 µg/ kg (1ppb). No se han observado efectos teratológicos o mutagénicos o efectos sobre la fertilidad (Costil et al., 1983; Kadir et al., 1990).

No se han descrito los efectos del carazolol sobre las características metabólicas, contráctiles y morfológicas de las fibras musculares esqueléticas del caballo en reposo o durante el ejercicio.

## **Hipótesis**

La administración de carazolol aumenta el metabolismo energético y las características morfológicas, metabólicas y contráctiles del músculo esquelético durante el entrenamiento o recuperación de los caballos de deporte.

## **Objetivo**

Determinar el efecto del carazolol sobre las características contráctiles (velocidad máxima de contracción), metabólicas (capacidad oxidativa, capacidad glucolítica, contenido de sustratos) y morfológicas (tamaño fibrilar, densidad de núcleos y capilares) de las fibras músculo esqueléticas en caballos sedentarios y de deporte.

## **Objetivos particulares**

1. Determinar y relacionar las características morfológicas, contráctiles y metabólicas del músculo esquelético de caballos sedentarios y en entrenamiento, mediante técnicas histológicas, histoquímicas cuantitativas y bioquímicas.
2. Determinar y analizar a nivel celular y molecular, el efecto de la administración de carazolol sobre:
  - 1) la actividad de las enzimas: trifosfatasa de adenosina miofibrilar, succinato deshidrogenasa, glicerol-3-fosfato- deshidrogenada,
  - 2) el contenido de glucógeno,
  - 3) área transversal, cantidad de capilares y de núcleos del músculo esquelético de caballos sedentarios y durante el entrenamiento de caballos deportivos.

## **METODOLOGÍA.**

### **Material y métodos**

Los animales se trataron de acuerdo a los lineamientos de la legislación Mexicana vigente para el uso de animales en experimentación (NOM-062-ZOO-1999).

La metodología planteada en el protocolo fue aprobada por el SICUAE.

### **Animales**

Se utilizaron 20 caballos adultos, de diferentes razas, de ambos sexos y clínicamente sanos dividido en dos grupos.

- I. Grupo de caballos sedentarios (SED n=10). Formado por 2 subgrupos, el primero sin tratamiento (n=5), (S) y el segundo (n= 5), (ST) tratado con una dosis intramuscular de carazolol durante 8 días (cuadro 2). Estos caballos sin ningún tipo de trabajo específico únicamente se encontraban en caballeriza y se soltaban al corral en el cual podían caminar y correr en libertad, sin embargo la mayor parte del día se encontraban buscando alimento

DIA 1	Peso	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA9	DIA 10
SUB GRUPO SEDENTARIO CON CARAZOLOL										
BIOPSIA BRUNO	318	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
BIOPSIA KAROLA	250	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
BIOPSIA BERLIOZ	461	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
BIOPSIA PONY PINTO	251	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
BIOPSIA PONY PRIETO	140	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
SUBGRUPO SEDENTARIO										
BIOPSIA TURQUEZA										
BIOPSIA TURCA										
BIOPSIA UBEDA										
BIOPSIA UNICA										
BIOPSIA URSULA										

Cuadro 2. Cronograma de trabajo grupos sedentarios

II. Grupo de caballos de deporte (DE n=10). Integrado por dos subgrupos, caballos de salto. Y estos estará dividido en dos, el primero sin tratamiento, (D) (n=5), y un segundo (DT), (n=5) tratado con una dosis intramuscular de carazolol durante 8 días (cuadro 3).

Todos los caballos de este grupo se mantuvieron con una actividad deportiva constante a base de 60 minutos como mínimo de entrenamiento, el cual consistía en paso, trote, galope y algunos días de una práctica de salto, 5 veces por semana. Esto se hizo con caballos que ya se encontraban habituados, y se continuó durante la semana de la administración del carazolol, en el caso de los caballos del grupo de tratamiento.

DÍA 1		DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8	DIA9	DÍA 10
<b>SUB GRUPO SEDENTARIOS CARAZOLOL</b>										
BIOPSIA ACICATE	PESO 513kg	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
BIOPSIA ARANZA	486kg	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
BIOPSIA JIMENA	461kg	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
BIOPSIA PASO DE ÁGUILA	568kg	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
BIOPSIA FULANO	413kg	PRIMERA DOSIS	2a Dosis	3a Dosis	4a Dosis	5a Dosis	6a Dosis	7a Dosis	8a Dosis	BIOPSIA MUSCULAR
<b>SUB GRUPO SEDENTARIOS</b>										
BIOPSIA CASUAL POINT	460Kg									
BIOPSIA GERRY	385Kg									
BIOPSIA GINA	345Kg									
BIOPSIA ROMARIO	485Kg									
BIOPSIA MEÑO	420Kg									

Cuadro 3. Cronograma de trabajo grupos Ejercicio

De cada uno de los caballos que conforman los grupos, se obtendrán biopsias del músculo glúteo medio a 8 cm de profundidad, mediante aguja percutánea.

Este músculo se ha seleccionado por su heterogenicidad fibrilar y facilidad de acceso. Las biopsias se obtuvieron previa infiltración de un anestésico subcutáneo (lidocaína 1ml).

En los dos grupos sin tratamiento, se realizará un solo Biopsia. A los caballos sedentarios y en ejercicio con tratamiento se les tomó biopsias musculares previas al tratamiento y al día siguiente de la última aplicación del tratamiento.

## **Fármacos.**

Se les administró una dosis de Carazolol durante 8 días, con intervalos de 24 horas a todos los caballos de los grupos tratados, con una dosis de 1 µg/ kg por vía intramuscular en la tabla del cuello, intercalando un día del lado derecho y al día siguiente del lado izquierdo con previa asepsia de la zona a puncionar.

Para poder estimar la dosis por caballo se utilizó una cinta métrica para calcular el peso por medio del diámetro del tórax a la altura de la cinchera.

## **Manejo y análisis de las biopsias musculares.**

Las biopsias se colocaron en solución salina al 0.9%, para permitir su relajación y posteriormente se congelaron en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y después de ser marcadas se mantuvieron en nitrógeno líquido a -160° C. Las muestras se conservaron a -70°C hasta su corte. Se utilizó un criotomo a -20°C para hacer cortes transversales, seriados, de 10 µm de grosor colocando de 3 a 4 cortes por laminilla y se mantuvo en congelación hasta su análisis histoquímico e histológico.

Estas biopsias se analizaron con técnicas histológicas e histoquímicas-cuantitativas. Las cuales permitieron realizar una caracterización fibra a fibra en base a sus morfología (arquitectura fibrilar, densidad de mionúcleos y capilares), características contráctiles (actividad mATPasa e isoformas de las cadenas pesadas de miosina) y metabólicas (actividad oxidativa o glucolítica, y determinación de sustratos energéticos). Las secciones se examinaron por medio de microscopia óptica de luz y se buscarán secciones libres de artefactos con ~60 fibras para su digitalización. Los diferentes parámetros musculares se cuantificaron mediante el empleo de un sistema de análisis de imagen y programas computacionales convencionales (Mac Biophotonics Image J versión 1.41a). (Brooke y Kaiser, 1970; de Guth y Samaha, 1969; Blanco *et al.*, 1988; Christensen y Strange, 1987; Nibbering *et al.*, 1986; Andersen y Henriksson, 1977; Quiroz Rothe y López Rivero, 2001)

### *Histología*

Secciones contiguas se tiñeron con la tinción de Hematoxilina y Eosina, con el fin de conocer la arquitectura, el área y la densidad de núcleos. La tinción con ácido periódico de Schiff (PAS), utilizando una solución ácida por 5 minutos a 37°C. Otras secciones se incubarán por 10 minutos a 37°C en solución de  $\alpha$ -amilasa al 2.2% y se teñirán con el mismo protocolo de PAS (Andersen y Henriksson, 1977). Estas secciones se utilizaron para visualizar capilares y como tejidos blanco para cuantificar el contenido de glucógeno relativo en fibras individuales.

### *Histoquímica*

*La actividad metabólica se determinó por medio de las tinciones de alfa GDPH, la cual nos muestra la actividad glucolítica de la fibra muscular y la histoquímica de succinil deshidrogenasa (SDH), que marca la cantidad que hay de esta encima y depende de la cantidad de mitocondrias en las célula.*

La contractibilidad de las fibras se determinó de acuerdo a la actividad de la enzima mATP-asa según modificación de Picard *et al.*, (1998) al método de Brooke y Kaiser, (1970) y de Guth y Samaha, (1969), para pre-incubaciones ácidas y alcalinas, respectivamente. La actividad miofibrilar de la mATP-asa, se determinará en pre-incubaciones ácidas a pH 4.6 y 4.3 por 10 a 15 minutos, respectivamente, y en pre incubaciones alcalinas a pH 10.48 por 30 minutos. Estos protocolos permitirán distinguir tres niveles de intensidad de teñido (claro, medio y oscuro).

En el caso de las respuestas histoquímicas cualitativas la única forma de valorar la respuesta fue a través de una medición de la densidad óptica, la cual nos dio un valor de cero a uno, en la cual cero es negro y uno es cercano al blanco, por lo que le hicimos una transformación al restarle uno.



## **Estudio preliminar**

Debido a que al inicio de la investigación no teníamos mucha información del carazolol administrado en caballo y a que no hay reportes de tantos días de transporte, se realizaron dos pruebas preliminares:

La primera se hizo con el fin de ver si la dosis administrada en cerdos y vacas, es funcional en el caso de caballos, ya que no existe ningún trabajo relacionado con la administración de carazolol en caballos. Para lo cual se le administró la dosis de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por vía intramuscular durante 8 días a un caballo sedentario de 318 kg y se le tomó una muestra inicial con el mismo protocolo antes mencionado.

Una segunda prueba preliminar fue si la administración del carazolol tenía un efecto a corto plazo y ver en cuantos días de administración tenía una mejor respuesta, para lo que se le administró la dosis de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  por vía intramuscular a una yegua sedentaria y se le tomó una biopsia muscular al día 0, 4 y 9 de tratamiento.

**Análisis estadístico.** Mediante programas estadísticos computarizados (JMP 5.0.1), se realizaron cálculos de estadística descriptiva, medias y errores estándar de la media, realizando un análisis de varianza del tratamiento sobre *i)* los tipos de fibras musculares, *ii)* y de ahí una correlación con la actividad metabólica de las fibras musculares, *iii)* el área total de las fibras musculares y *iv)* el número de capilares se analizará por medio de un modelo lineal que considerará el efecto del animal y la interacción de estos dos. Se llevó a cabo un análisis de correlación entre el tratamiento y las características contráctiles, la actividad metabólica y las características morfológicas de las fibras musculares. Se utilizarán medias de cuadrados mínimos y errores estándar para llevar a cabo comparaciones entre tratamientos y comparaciones múltiples entre tratamientos y tiempo.

## **RESULTADOS**

### **Estudios preliminares**

#### **Resultados preliminares uno**

En este caso sólo se hizo una evaluación subjetiva en la que únicamente se observaron cambios en la estructura morfológica al encontrarse que después de 8 días de tratamiento se observaron un cambio en el arreglo y tamaño de las fibras musculares.

#### **Resultados estudio preliminar dos**

Estudio preliminar. Se anexa el trabajo presentado al XXXI Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios especialistas en equinos, Puerto Vallarta, 2009.

**EFFECTO DEL CARAZOLOL EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DEL CABALLO: OBSERVACIONES PRELIMINARES.** Valderrama ME, Quiroz-Rothe E, Ocampo CL.

#### **Resultados preliminares**

Se cuantificaron fibras 150 y se determinó en una relación fibra a fibra, y al día 0, el 20% de las fibras son tipo I, el 50% tipo IIX y el 30% son IIA. Al día 4, 15% de fibras son tipo I, 45% de fibras son tipo IIX, y 40% tipo IIA. Al día 9 el 16.6% de células son tipo I, 33.3% de fibras tipo IIX y un 50% de fibras IIA. Las fibras tipo I son esenciales en las actividades musculares de larga duración y baja intensidad (p.e: funciones posturales o ejercicios de resistencia) (López et al., 1993). Estas presentan un menor tamaño, un diámetro y un área de sección transversal inferiores a las que se observaron en las fibras tipo II. Desde el punto de vista teórico, las fibras de menor tamaño están mejor habilitadas para realizar metabolismo oxidativo que las de mayor tamaño ya que un diámetro pequeño facilita una mejor difusión de oxígeno y nutrientes; además de facilitar la excreción de lactatos y productos metabólicos de desecho cuya acumulación intrafibrilar es causa de fatiga (Essén-Gustavsson et al., 1984).

Las fibras tipo II o de contracción rápida y vigorosa (p.e: ejercicios de corta duración y alta intensidad) (Essén-Gustavsson, 1991), se dividen en subtipos IIA y IIB (X) (Essén-Gustavsson, 1986). Desde el punto de vista mecánico, la generación de fuerza muscular está relacionada con el área de sección transversal de las fibras involucradas en la función. Por lo tanto, la mayor área de sección transversal de las fibras tipo IIB (X), en comparación con las fibras tipo I y IIA, significa que si un número igual de fibras tipo IIB son reclutadas durante el ejercicio, ellas producen una mayor fuerza (Valberg et al., 1985). La técnica mATPasa, mostró una apariencia del patrón fibrilar normal. Las fibras se encuentran distribuidas en forma de mosaico, no observándose alteraciones patológicas. Sin embargo se ha demostrado que las propiedades contráctiles del músculo e intensidad de la tinción con mATPasa, dependen de las cadenas pesadas de miosina de las fibras (Bottinelli et al., 1994) y que las técnicas histoquímicas no permiten identificar algunos tipos de fibras, en particular las híbridas que presentan coexpresión de las cadenas pesadas de miosina, (Sinha y col. 1992). Además la capacidad metabólica de las fibras se evalúa con la tinción nicotinadenina dinucleótido tetrazolium reductasa (NADH-TR), que permite clasificar las fibras tipo IIB en oxidativa y no oxidativa, según la intensidad de la tinción (Brooke y Kaiser 1970; Valberg et al. 1985)(figura 7).

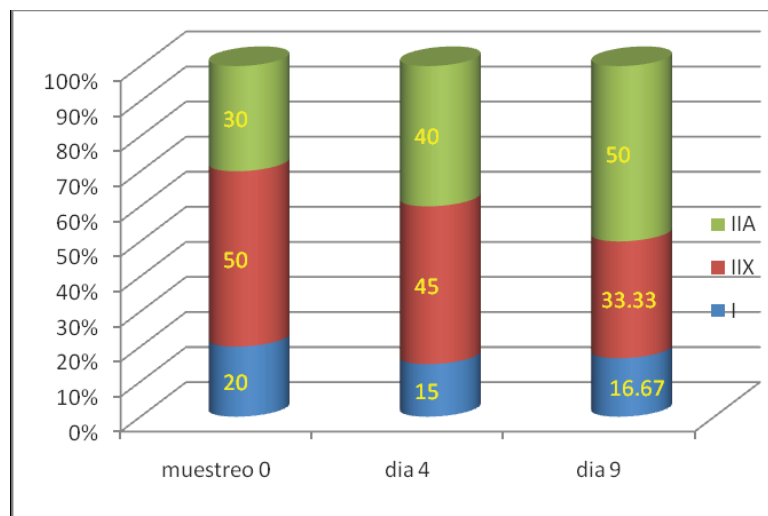


Figura 7. Distribución porcentual de los tipos fibras musculares antes, durante y después del tratamiento con carazolol en el caballo.

## **Resultados finales**

En base al análisis estadístico se obtuvieron los siguientes resultados mostrando una comparación directa entre el tipo de fibras de cada uno de los grupos control contra el tratado (tabla 4.1-4.6) y (figura 8).

### **Tipificación celular**

La tipificación celular se realizó en base a la respuesta de la histoquímica de ATPasa alcalina la cual nos da tres niveles de tonalidades en base a la densidad óptica en la que las células más oscuras corresponden a las fibras IIX, las de densidad media son tipo IIA y las más claras son las fibras tipo I, y en base a este resultado se obtuvo lo siguiente:

Del conteo de fibras celulares se pudieron localizar las mismas fibras en todas las tinciones con un total de 350 fibras musculares del grupo sedentario (S), 307 del grupo sedentario tratado con carazolol (ST), 305 fibras contadas del grupo ejercicio (D) y 310 fibras del grupo ejercicio tratado con carazolol (DT) y en base a estas células se obtuvieron estos resultados.

El porcentaje de célula tipo I para los grupos S es de 13.4% y de 14.33% para ST y para los grupos D es de 20\* y 7.09\* % para DT. En el caso de las células tipo IIA fue de 36, 34.52, 42.96\* y 49.35\* % respectivamente. Y en el caso de las células tipo IIX fue de 50.57, 51.14, 37.04\* y 43.55\* % respectivamente, con un valor significativo de  $P < 0.05$  para la diferencia porcentual de los grupos de ejercicio, en el caso de los grupos sedentarios no existió diferencia significativa con la prueba de comparación de proporciones (Figura 9).

Para la cual se encontró que al comparar sedentarios contra ejercicio si hay diferencias significativas al haber una reducción en la cantidad de fibras tipo IIX y un incremento en las células tipo IIA y I. En el caso del grupo de ejercicio al administrarle el carazolol el porcentaje de células tipo I se redujo y aumentó el porcentaje de células tipo IIA y de IIX. Y

en el caso de los sedentarios antes y después del tratamiento no hay diferencia significativa en el porcentaje de población.

En la correlación de cada uno de los valores que a continuación se mencionan contra el tipo celular se encontró lo siguiente.

### **Morfología**

Dentro de los cambios morfológicos de las fibras musculares se evaluó el área la cantidad e núcleos y de capilares.

**Área de la fibra muscular** en un corte transversal, (la cual se da el valor en micras cuadradas).

El área para la fibra tipo I, la media es de 1349.96 en S con una desviación estándar de 145.68, 892.39 para ST y 147.29 de desviación estándar, 1287.23 para D con una desviación estándar de 126.51 y 1110.14 para DT con 210.66 de desviación estándar y con una  $P = 0.1158$

El área en las fibras tipo IIA para el grupo S de 1388.68 con una desviación estándar de 81.17, para el grupo ST, 720.46 con una desviación estándar de 87.73, para el grupo D 1750.69 con una desviación estándar de 79.29 y para el grupo DT 1445.14 y una desviación estándar de 73.37. Con una  $P < 0.0001$ . (Figura 10)

El área en las fibras IIX en el grupo S 1447.39, en el grupo ST 696.78, para el grupo D 1691.89 y en el grupo DT 1741.85 con una desviación estándar de 76.07, 80.74, 95.47 y 87.34 respectivamente con una  $P < 0.0001$

En este caso hay una reducción significativa en el tamaño de las células musculares después del tratamiento con carazolol después de 8 días en todos los tipos celulares, sin embargo en el caso de los de ejercicio no hay cambios significativos

## **Núcleos**

La media de núcleos por célula en las fibras tipo I fue de 4.5, 4.5, 3.5 y 4.3 para las fibras tipo IIA fue de 4.3, 4.3, 4.1 y 4.7, y en las fibras IIX es de 3.9, 4.1, 3.0 y 4.3, estas últimas con un valor significativo con una  $P < 0.0001$ .

En el caso de los grupos de ejercicio si se dio un incremento significativo en la cantidad de núcleos al ser tratados con carazolol, en los sedentarios no hay cambios (Figura 11).

## **Capilares**

La media del número de capilares por fibra muscular es de:

Para las fibras tipo I es de 4.15 en el grupo S, 5.24 para el grupo ST, de 6.38 para el grupo D y de 5.45 para el grupo ST. En las fibras IIA es de 4.19, 5.03, 7.07 y 6.2 respectivamente y para las fibras IIX es de 4.17, 4.99, 6.69 y 5.96. Con una  $P < 0.0001$  para esta prueba.

En la cantidad de capilares en el grupo sedentario se dio un aumento significativo en la capilaridad y en el caso del grupo de ejercicio al ser tratados con el carazolol se redujeron la cantidad de capilares (Figura 12).

## **PAS**

La densidad óptica de PAS para las fibras tipo I de 0.5014 en el grupo S, 0.3756 en el grupo ST, de 0.5364 para el grupo D y de 0.2350 para el grupo DT.

Para las fibras IIA la densidad óptica es de 0.4954 en el grupo S, para el grupo ST de 0.4147, para el grupo D es de 0.6116 y para el grupo DT es de 0.2651.

En las fibras IIX la densidad óptica es de 0.4976 para el grupo S, de 0.4237 para el grupo ST, de 0.5156 para el grupo D y de 0.2292 para el grupo DT.

Estos datos nos marcan un descenso importante en los animales tratados con carazolol tanto en el grupo de sedentarios como en el de ejercicio. Y existe una diferencia

significativa entre los grupos testigos ya que el grupo de ejercicio tiene una mayor cantidad de sustrato que el grupo sedentario (Figura 13).

### **Alfa PAS**

La densidad óptica para las fibras tipo I del grupo S nos dieron una media de 0.4533, para el grupo ST de 0.2548, para el grupo D fue de 0.3529 y para el grupo DT fue de 0.3481.

Para las fibras IIA la densidad de Alfa PAS es de 0.4357 para el grupo S, de 0.2535 para el grupo ST, de 0.3775 para el grupo D y de 0.3440 para el grupo DT

Y para las fibras IIX la densidad óptica es de 0.4343 para el grupo S, para el grupo ST es de 0.2649, para el grupo D es de 0.3277 y para el grupo ST es de 0.3153.

En cuanto a la cantidad de sustratos polisacáridos hay una disminución entre el grupo sedentario y el grupo ST, en los animales del grupo de ejercicio no hay diferencias significativas (Figura 14).

### **Resultados Histoquímicos**

#### **Alfa GDP**

La densidad óptica para las fibras tipo I del grupo S nos dieron una media de 0.5972, para el grupo ST de 0.4351, para el grupo D fue de 0.3958 y para el grupo DT fue de 0.0323.

Para las fibras IIA son de 0.5727 para el grupo S, de 0.5201 para el grupo ST, 0.4221 para el grupo D y de 0.3423 para el grupo DT.

En las fibras IIX fue de 0.5639 en el grupo S, de 0.6003 para el grupo ST, de 0.4637 para el grupo D y de 0.4014 para el grupo DT.

En general se observa una disminución en la actividad del glicerol 3 fosfato deshidrogenasa hay una disminución es su actividad siendo la más activa los caballos

sedentarios, después los sedentarios tratados después los de ejercicio y al final los de ejercicio con carazolol (Figura 15).

### **SDH**

La densidad óptica de las fibras tipo I es de 0.5482 para el grupo S, para el grupo ST es de 0.6723, para el grupo D es de 0.4242 y para el grupo DT es de 0.3963.

Para las fibras IIA la media de la densidad óptica es de 0.5044 en el grupo S, de 0.6163 para el grupo ST, de 0.5084 en el grupo D y de 0.3353 en el grupo DT.

En las fibras tipo IIX es de 0.4730 en el grupo S, 0.5909 en el grupo ST, de 0.4320 en el grupo D y de 0.3980 en el grupo DT.

En el caso del succinato deshidrogenasa en los animales sedentarios se dio un aumento de la actividad de esta enzima y en el grupo de ejercicio se dio una disminución en la actividad de esta al ser tratada con carazolol (Figura 16).

### **ATP asa alcalina**

En las fibras tipo I en el grupo S la densidad óptica es de 0.3854, de 0.3696 en el grupo ST, de 0.4251 en el grupo D y de 0.3718 para el grupo DT.

En las fibras IIA es de 0.4833 en el grupo S, en el grupo ST es de 0.5024, en el grupo D es de 0.5671 y en el grupo DT es de 0.4913.

En las fibras tipo IIX en el grupo S es de 0.5485, en el grupo ST es de 0.6483, en el grupo D es de 0.7157 y en el grupo DT es de 0.5877.

Los cambios que se encuentran en la mATP asa en las fibras tipo I no se encuentra un cambio significativo, en el caso de las fibras IIA en el caso del grupo de ejercicio la actividad del ATP asa es mayor que en los demás grupos y en el caso de las fibras IIX en los caballos del grupo de sedentarios se ve un aumento significativo al ser tratados con



carazolol y en el grupo de ejercicio se ve una disminución significativa al tratarlos con carazolol (Figura 17).

En el cuadro 5 se muestra un resumen de la respuesta que hay entre caballos sedentarios y de ejercicio y la comparación entre caballos sedentarios y de ejercicio con y sin tratamiento.

## DISCUSIÓN

El caballo siempre ha representado a la especie animal deportiva por excelencia, la evaluación del rendimiento y la relación genética de esta especie la ha llevado al desarrollo de diferentes técnicas de evaluación morfofisiológica del deporte.

El interés por determinar la tolerancia al ejercicio e identificar factores involucrados en la fatiga han sido obligadas en diferentes disciplinas ecuestres (Hindecliff et al., 2004; Morris y Seeherman, 1991). La evaluación cardiopulmonar y metabólica del músculo esquelético ha sido el núcleo de estas investigaciones (Morris y Seeherman, 1991; Martin et al., 2000; Asheim et al., 1970). El estudio de los cambios fisiológicos, morfológicos celulares y moleculares del músculo esquelético equino han permitido clasificar sus propiedades contráctiles metabólicas y morfológicas frente a estímulos fisiológicos (ejercicio, entrenamiento y desentrenamiento), patológicos (miopatías primarias y secundarias) y farmacológicos (p.e. anabólicos, relajantes, antiinflamatorios, etc.)(Hindecliff et al., 2004; Valelle et al., 1996; Quiroz, 2001).

La adaptación morfo-metabólica contráctil del músculo se da en relación a la frecuencia intensidad y duración del ejercicio o del estímulo aplicado.

Esta situación se ha descrito ampliamente en la literatura especializada (Valelle et al., 1996; Martin et al., 2000; Morris y Seeherman, 1991). Sin embargo, la mayor parte de los estudios no se realizaron en condiciones medioambientales consideradas como la hipoxia isobárica (más de 1500m sobre el nivel del mar) así, desarrollamos en este trabajo el estudio del fenotipo muscular en caballos sedentarios y realizando un protocolo convencional de caballos de salto.

El objetivo del presente trabajo fue conocer si el carazolol como un fármaco  $\beta_3$  agonista y antagonista  $\beta_1$  y  $\beta_2$  adrenérgico, tenía la capacidad de generar un cambio metabólico para

los caballos de ejercicio y sedentarios. Además identificar si el cambio es únicamente a nivel metabólico o también generaba un cambio estructural en el músculo estriado esquelético.

Es sabido que el efecto catecolaminérgico durante el ejercicio o a situaciones de estrés, sobre el músculo esquelético, tiene una amplia gama de respuestas que van desde un en la capacidad de transmisión eléctrica, metabólica y morfológicas (Kaiser et al., 1995)

Los resultados aquí descritos nos muestran una respuesta muy diferentes entre los animales sedentarios y los animales que se encuentran bajo una actividad deportiva.

En la tipificación celular de los caballos sedentarios, cambia mucho de otros trabajos realizados en caballos sin entrenamiento en los que la cantidad de fibras tipo I es mayor, ya que estos animales estaban bajo un ejercicio de baja intensidad, pero alta duración, con una media de 23% de estas fibras y un menor porcentaje de células IIX (Linnane et al., 1999).

En el presente estudio se encontró que en los caballos que realizan ejercicio, y no recibieron tratamiento, la distribución de las fibras musculares se comporto de una forma muy similar a los caballos de endurance, después de 8 meses de entrenamiento (Serrano et al 2000). Después del tratamiento con carazolol, ocho días, los porcentajes fibrilares se modificaron de tal manera que la distribución de las fibras parecían más a las de un caballo de carreras con un entrenamiento específico a V4 ( 4 mmol/l de ácido láctico) y una duración de 25 minutos durante 11 sesiones cada tercer día (Rivero et al, 2007).

Para realizar esta comparación hay que considerar que el efecto del entrenamiento en el músculo esquelético tiene una respuesta inducida por edad, peso, alimentación acondicionada por la duración, intensidad, frecuencia y respuesta ambiental, ya que el trabajo de estos con los grupos de este experimento, no fueron los mismos protocolos de entrenamiento y estas diferencias, al menos en los caballos sin tratamiento, tanto sedentarios como en ejercicio, se pueden correlacionar por una variante aplicada entre los

grupos de trabajo y eso es la altitud, ya que la mayoría de los trabajos referidos se han hecho en lugares por debajo de los 1000 m. de altura sobre el nivel del mar y los realizados en este trabajo, se hicieron en la ciudad de México, por arriba de los 2780 m. de altitud; para lo cual se han reportado trabajos en los que el músculo por arriba de los 2400 m., son menos oxidativos y son más glucolíticos y reducen la capacidad de los capilares, mostrando un cambio a corto plazo en su estructura, después de dos meses de exposición aguda a hipoxia, en caminatas a través de los Himalaya.

Esto está relacionado con un aumento de la subunidad del factor inducido por hipoxia - 1(HIF-1) modificando los niveles de mRNAs para mioglobina, factor de crecimiento endotelial y para enzimas glucolíticas como la fosfofructoquinasa, junto con un aumento en la densidad de los capilares y mitocondrial (Hoppeler et al., 2001).

#### Características morfológicas

Las características morfológicas con la tinción HE evalúan las características del músculo esquelético, como es el área transversal, pudiendo diferenciar si existe hipertrofia o atrofia selectiva por morfometría, variación en la densidad nuclear y densidad capilar (alfa amilasa PAS), así como una evaluación cualitativa de la cantidad de glucógeno (tinción de PAS) o carbohidratos de alta densidad (alfa amilasa PAS).

#### Área:

En el grupo de caballos sedentarios se observó una reducción del área transversal de alrededor del 50 % las fibras musculares después del tratamiento con carazolol en los tres tipos celulares. En los caballos de ejercicio sólo se observa una reducción en el área de las fibras IIA del 17% atribuible a una hipotrofia celular; tomando en cuenta que el efecto de los  $\beta_3$  agonistas adrenérgicos es inhibir la proteólisis (Mersmann, 1998) es factible pensar, que ésta disminución en el área, se podría relacionar con un consumo acelerado de los depósitos de grasas intrafibrilar, ya que se ha reportado que éste puede ocupar un porcentaje de la célula y se sabe en otras especies, por ejemplo en el perro, que existe un

depósito de grasa alrededor de las mitocondrias (Vock et al., 1996) por lo que podría ser únicamente por consumo de reservas de energía aún cuando esto no se puede corroborar en este momento.

#### Núcleos:

Este análisis, mostró un aumento significativo en la cantidad de núcleos por célula en el grupo de caballos que realizan ejercicio tratados, y pudiera estar relacionado con un aumento en la transcripción de genes y que la célula muscular está siendo estimulada en una forma muy activa ya que esto se presenta en casos de regeneración celular (Quiroz, 2001).

#### Capilares

En el grupo de caballos sedentarios tratados con carazolol, se observó un aumento en la densidad de capilares y una reducción de éstos en los caballos de deporte; esto se puede relacionar directamente con el efecto del carazolol, ya que reduce la glucólisis, y aumenta el metabolismo oxidativo y, al tener un efecto barotrópico cardíaco (Gregory et al., 1982), el músculo requiere mayor cantidad de O<sub>2</sub> por lo que se estimula un incremento en la cantidad de capilares, para poder suplir las necesidades de O<sub>2</sub> en el músculo. Cuando la difusión de los gases y el paso de los sustratos especialmente los ácidos grasos se reducen, incrementa la capilaridad (Saltini et al., 1983).

En el caso de los caballos de deporte, esta reducción en la cantidad de capilares se puede asociar con una las mismas características mencionadas en los caballos sedentarios, pero en un funcionamiento inverso. Al existir una gran difusión de sustratos los capilares se reducen junto con la hipotensión generada por los receptores  $\beta_3$  (Saltini et al., 1983).

## PAS

En el presente se encontró que el contenido interfibrilar de glucógeno, después del tratamiento tanto en animales sedentarios y de ejercicio, se redujo. Sin embargo los caballos nunca se mostraron fatigados, sino que al parecer el metabolismo de fosfageno, debió haber sido el que supliera la cantidad de energía necesaria para realizar su trabajo.

El incremento de glucosa en el músculo esquelético es el resultado de un incremento coordinado entre el nivel de glucosa transportado por medio de los capilares y de la superficie transportadora de glucosa y del sustrato almacenado dentro de la célula, para realizar la glucólisis; el mecanismo entre el desplazamiento de los GLUT-4 a la superficie de la membrana y el incremento en el transporte de glucosa generado por la contracción muscular, no se ha resuelto, pero al parecer ocurre por la señalización intracelular de la calmodulina dependiente de protein quinasa, 5'AMP, activada por protein cinasa y posiblemente protein cinasa C (Kuo et al 1996).

Además la estimulación de los receptores  $\beta_2$  inhiben la actividad de GLUT-4 durante la actividad deportiva, por lo que se asume que la inhibición de los receptores beta adrenérgicos (Kuo et al 1996).

Respuesta en la histoquímica.

El metabolismo muscular se ha evaluado principalmente en base a su actividad oxidativa o glucolítica, esto se da al hacer una correlación entre la respuesta de la tinción de alfa GPDH y de la SDH y contenido de glucógeno.

El efecto de los  $\beta_3$  agonistas sobre el metabolismo aeróbico del músculo, es el de aumentar la fosforilación del 2 deoxiglucosa en un 40%, la oxidación de la glucosa en un 50%, la oxidación del palmitato en un 70% y la oxidación de piruvato indicando una estimulación de las reacciones del ciclo del ácido tricarboxílico (Board et al 2000)

Los ajustes metabólicos durante el ejercicio en estados de hipoxia por altitud, se atribuyen a cambios en el comportamiento del sistema nervioso simpático, generando un aumento y dando como respuesta, baja en la  $PO_2$  arterial, reducción en el  $O_2$ ; como consecuencia de la utilización de éste, no existe una reducción en la capacidad anaeróbica y hay un aumento en la ganancia de grasas, como respuesta a la reducción en respiración celular. Sin embargo no hay diferencia de los niveles de catecolaminas entre normoxia o hipoxia y no hay diferencia en la cantidad de ácido láctico, producido bajo el mismo ejercicio a diferentes altitudes. (kayser et al., 1996, Favier et al., 1996)

Por lo que se podría encontrar una correlación entre el efecto del fármaco y el estímulo del ejercicio.

## CONCLUSIÓN

La aplicación de carazolol durante 8 días a los caballos sedentarios y que realizan ejercicio produjo las siguientes respuestas sobre el musculo: el cambio metabólico y estructural, potencializando su efecto en el grupo de caballos que realiza ejercicio. Se encontró una respuesta efectiva esperada como agonista  $\beta_3$  adrenergico ,aumentando la capacidad oxidativa de las fibras musculares en los caballos sedentarios y una inhibición de la glucólisis; sin embargo, en el caso de los caballos de deporte tratados, el metabolismo muscular se modificó la respuesta de una manera muy marcada, disminuyendo tanto la capacidad oxidativa como la glucolítica,

Estas respuestas metabólicas y estructurales en las fibras musculares de los caballos, no se han podido explicar debido a la falta de investigaciones en cuanto a un efecto clínico del carazolol y nos abre una gama de líneas de investigación, como es el estudiar la interacción de los receptores  $\beta_3$  durante la actividad deportiva y el ampliar este trabajo sobre la respuesta lipídica, así como es la interacción de la altitud con el deporte en los caballos y la respuesta del carazolol sobre el aspecto clínico como podría responder en caballos con miopatías y poder correlacionar muchas de las respuestas obtenidas en este trabajo.



## ANEXOS

**Cuadro 4.1. TIPO MUSCULAR IIX EN ANIMALES SEDENTARIOS**

GRUPO	SEDENTARIOS		SEDENTARIOS CARAZOLOL		
TINCIÓN\ VALOR	MEDIA	D.S.	MEDIA	D.S.	P DE PRUEBA
ÁREA	1447.3900	76.0667	696.7800*	80.7376	<0.0001
NÚCLEOS	3.9045	0.1343	4.1329	0.1425	<0.0001
CAPILARES	4.1742	0.1117	4.9937	0.1186	<0.0001
PAS	0.5024	0.0090	0.5763	0.0096	<0.0001
ALFA PAS	0.5657	0.0087	0.7351	0.0092	<0.0001
ALFA GPDH	0.4361	0.0112	0.3997	0.0119	<0.0001
SDH	0.5270	0.0082	0.4091	0.0087	<0.0001
ATP ALCALINO	0.4515	0.0082	0.3517	0.0088	<0.0001
NO DE CÉLULAS	177.00		157.00		
PORCENTAGE DE POBLACIÓN	50.57		51.14		p>0.05
TOTAL DE CÉLULAS	350.00		307.00		

**Cuadro 4.2. TIPO MUSCULAR IIA EN ANIMALES SEDENTARIOS**

GRUPO	SEDENTARIOS		SEDENTARIOS CARAZOLOL		
TINCIÓN\ VALOR	MEDIA	D.S.	MEDIA	D.S.	P DE PRUEBA
ÁREA	1388.6800	81.1718	720.4600	87.7341	<0.0001
NÚCLEOS	4.2800	0.1706	4.2710	0.1844	0.0582
CAPILARES	4.1920	0.1311	5.0280	0.1418	<0.0001
PAS	0.5046	0.0127	0.5853	0.0138	<0.0001
ALFA PAS	0.5643	0.0089	0.7465	0.0096	<0.0001
ALFA GPDH	0.4273	0.0130	0.4799	0.0140	<0.0001
SDH	0.4956	0.0123	0.3837	0.0133	<0.0001
ATP ALCALINO	0.5167	0.0092	0.4976	0.0099	<0.0001
NO DE CÉLULAS	126.0		106.0		
PORCENTAGE DE POBLACIÓN	36.0		34.5		p>0.05
TOTAL DE CÉLULAS	350.00		307.00		

**Cuadro 4.3. TIPO MUSCULAR I EN ANIMALES SEDENTARIOS**

GRUPO	SEDENTARIOS		SEDENTARIOS CARAZOLOL		
TINCIÓN\ VALOR	MEDIA	D.S.	MEDIA	D.S.	P DE PRUEBA
ÁREA	1349.9600	145.6848	892.3900	147.2946	0.1158
NÚCLEOS	4.5435	0.3352	4.5111	0.3389	0.0755
CAPILARES	4.1522	0.2279	5.2444	0.2304	<0.0001
PAS	0.4986	0.0199	0.6244	0.0201	<0.0001
ALFA PAS	0.5467	0.0161	0.7452	0.0163	<0.0001
ALFA GPDH	0.4028	0.0224	0.5649	0.0226	<0.0001
SDH	0.4518	0.0192	0.3277	0.0194	<0.0001
ATP ALCALINO	0.6146	0.0174	0.6304	0.0176	0.0719
NO DE CÉLULAS	47		44		
PORCENTAGE DE POBLACIÓN	13.42		14.33		p>0.05
TOTAL DE CÉLULAS	350.00		307.00		

**Cuadro 4.4. TIPO MUSCULAR IIX EN ANIMALES DE EJERCICIO**

GRUPO	EJERCICIO		EJERCICIO CARAZOLOL		
TINCIÓN\ VALOR	MEDIA	D.S.	MEDIA	D.S.	P DE PRUEBA
ÁREA	1691.8900	95.4697	1741.8500	87.3449	<0.0001
NÚCLEOS	3.0443	0.1685	4.2519	0.1542	<0.0001
CAPILARES	6.5929	0.1402	5.9630	0.1283	<0.0001
PAS	0.4844	0.0113	0.7708	0.0104	<0.0001
ALFA PAS	0.6723	0.0109	0.6847	0.0100	<0.0001
ALFA GPDH	0.5363	0.0140	0.5986	0.0128	<0.0001
SDH	0.5680	0.0103	0.6020	0.0094	<0.0001
ATP ALCALINO	0.2843	0.0104	0.4123	0.0095	<0.0001
NO DE CÉLULAS	113.0		135.0		
PORCENTAGE DE POBLACIÓN	37.0		43.6		p<0.05
TOTAL DE CÉLULAS	305		310		

**TIPO MUSCULAR IIA EN ANIMALES DE EJERCICIO**

**Cuadro 4.5**

GRUPO	EJERCICIO		EJERCICIO CARAZOLOL		
TINCIÓN\ VALOR	MEDIA	D.S.	MEDIA	D.S.	P DE PRUEBA
ÁREA	1750.6900	79.2911	1445.1400	73.3693	<0.0001
NÚCLEOS	4.0534	0.1667	4.6601	0.1542	0.0582
CAPILARES	7.0687	0.1281	6.1961	0.1185	<0.0001
PAS	0.3884	0.0124	0.7349	0.0115	<0.0001
ALFA PAS	0.6225	0.0087	0.6560	0.0080	<0.0001
ALFA GPDH	0.5779	0.0127	0.6577	0.0117	<0.0001
SDH	0.4916	0.0120	0.6647	0.0111	<0.0001
ATP ALCALINO	0.4329	0.0090	0.5087	0.0083	<0.0001
NO DE CÉLULAS	131.0		153.0		
PORCENTAGE DE POBLACIÓN	43.0		49.4		p<0.05
TOTAL DE CÉLULAS	305		310		

**Cuadro 4.6****TIPO MUSCULAR I EN ANIMALES DE EJERCICIO**

GRUPO	EJERCICIO		EJERCICIO CARAZOLOL		
TINCIÓN\ VALOR	MEDIA	D.S.	MEDIA	D.S.	P DE PRUEBA
ÁREA	1287.2300	126.5110	1110.1400	210.6599	0.1158
NÚCLEOS	3.5410	0.2911	4.3182	0.4847	0.0755
CAPILARES	6.3771	0.1979	5.4546	0.3295	<0.0001
PAS	0.4636	0.0173	0.7650	0.0288	<0.0001
ALFA PAS	0.6471	0.0140	0.6519	0.0233	<0.0001
ALFA GPDH	0.6042	0.0194	0.6605	0.0323	<0.0001
SDH	0.5758	0.0166	0.6037	0.0277	<0.0001
ATP ALCALINO	0.5749	0.0152	0.6282	0.0252	0.0719
NO DE CÉLULAS	61.0		22.0		
PORCENTAGE DE POBLACIÓN	20.0		7.1		p<0.05
TOTAL DE CÉLULAS	305		310		

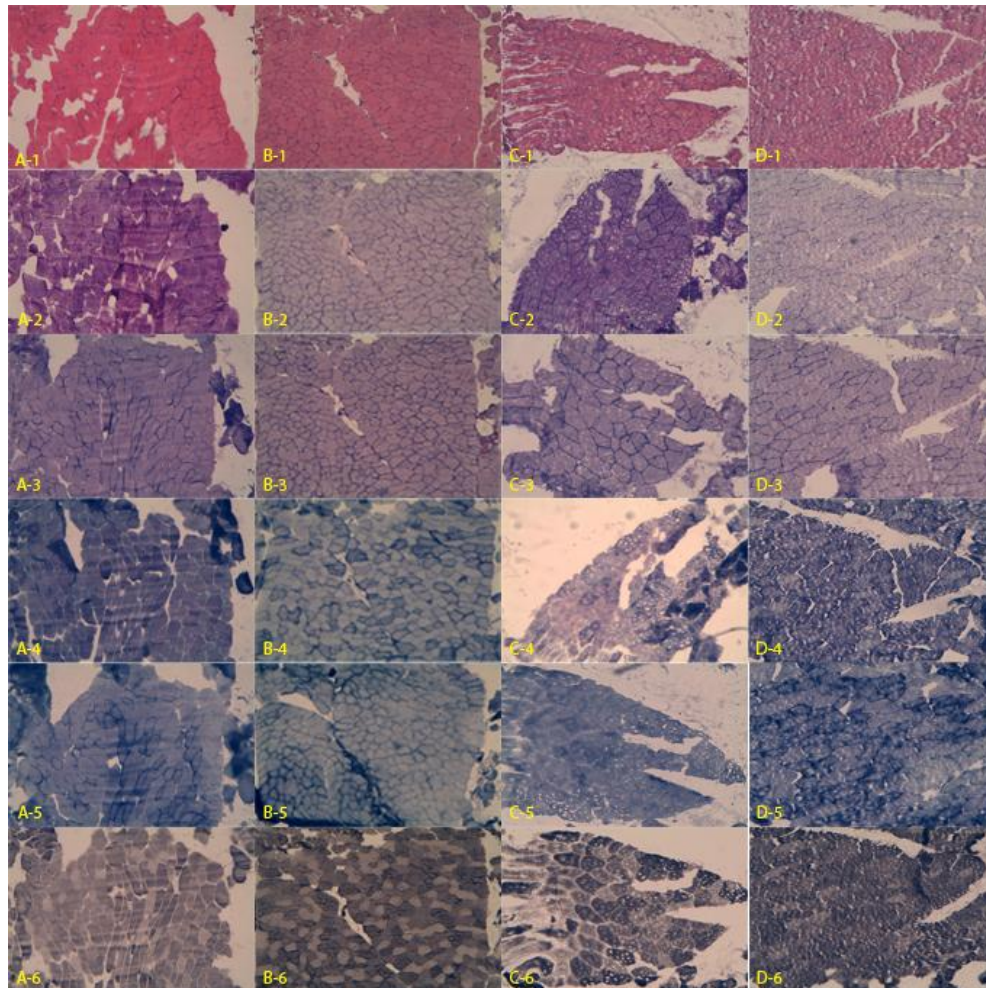


IMAGEN 8. Tinciones realizadas para la evaluación del efecto del carazolol en el músculo esquelético de caballos sedentarios y de ejercicio. (A) grupo sedentario, (B) grupo sedentario carazolol, (C) grupo ejercicio, (D) grupo ejercicio con carazolol, (1) hematoxilina, (2) PAS, (3) ALFA PAS, (4) ALFA GPDH, (5) SDH, (6) ATP.

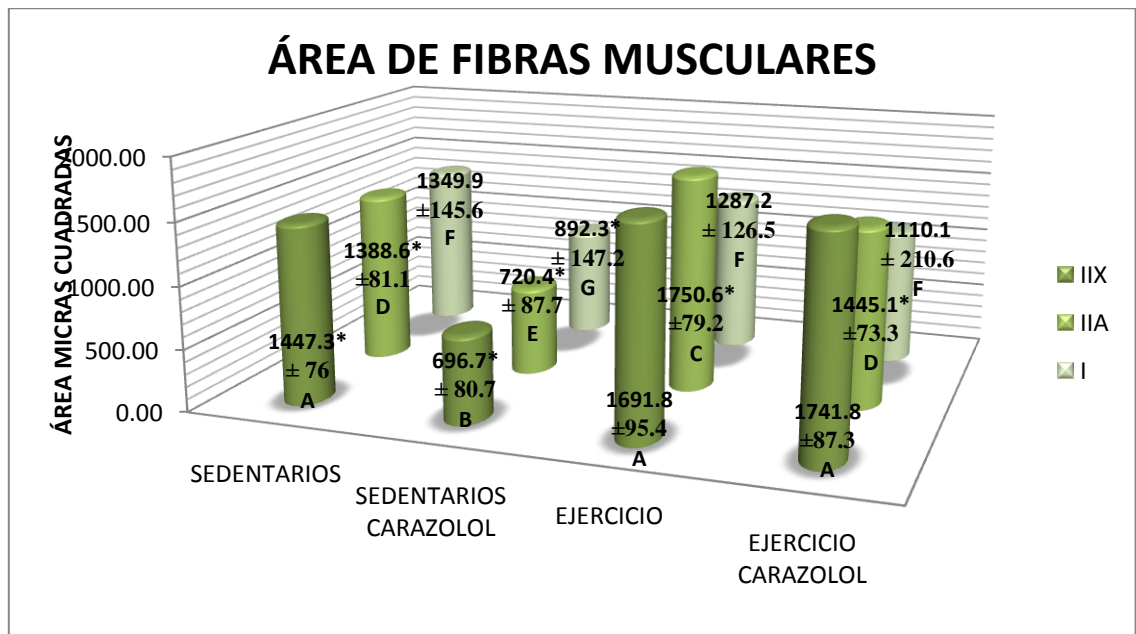
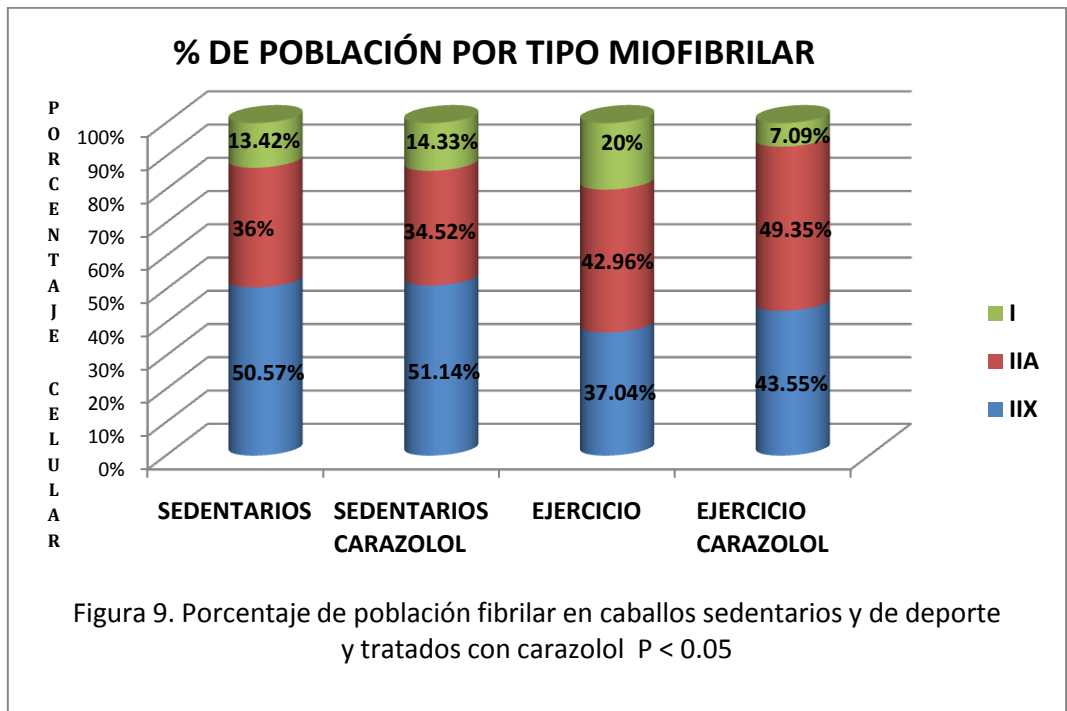


FIGURA 10. Efecto del carazolol sobre el área fibrilar en caballos sedentarios y de ejercicio tratados durante 8 días. Medias calculadas, (\*) significativamente diferente, (±) desviación estándar y <sup>A B C D E F G</sup> nos muestra su nivel y diferencias entre las medias.

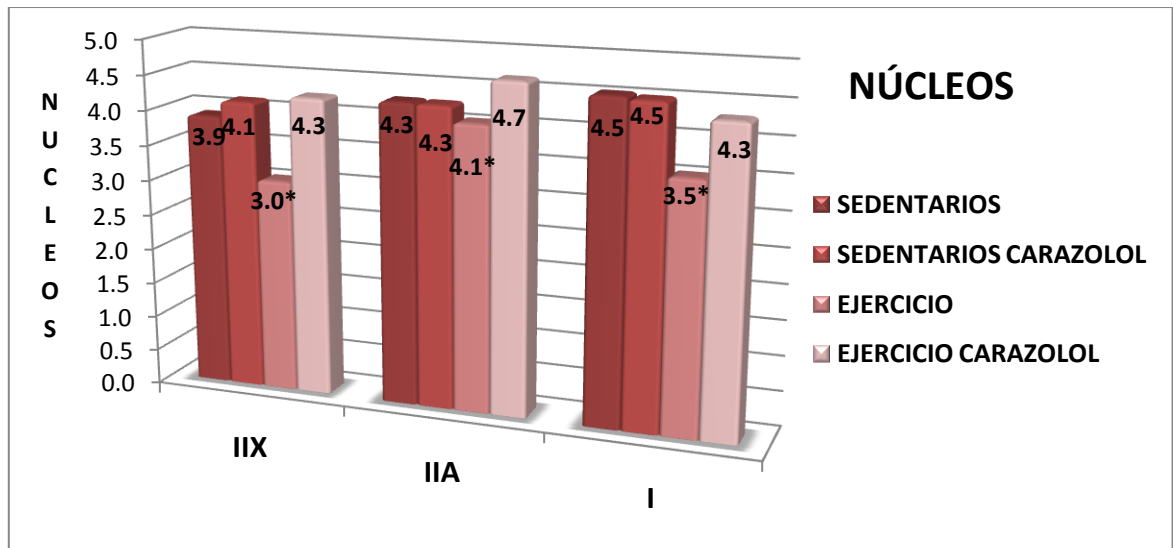


FIGURA 11. Efecto del carazolol en el número de núcleos presentes en las fibras musculares en caballos sedentarios y de ejercicio. Mostrando el valor de las medias calculadas, (\*) significativamente diferente.

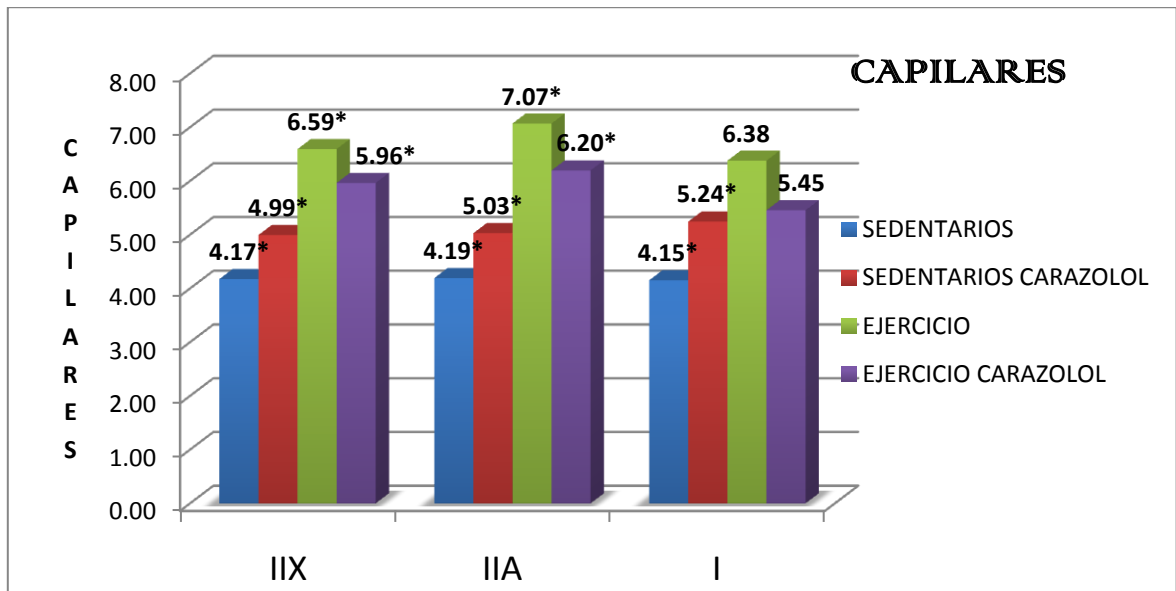


FIGURA 12. Efecto de carazolol sobre el número de capilares por célula muscular con medias calculadas, (\*) significativamente diferente.

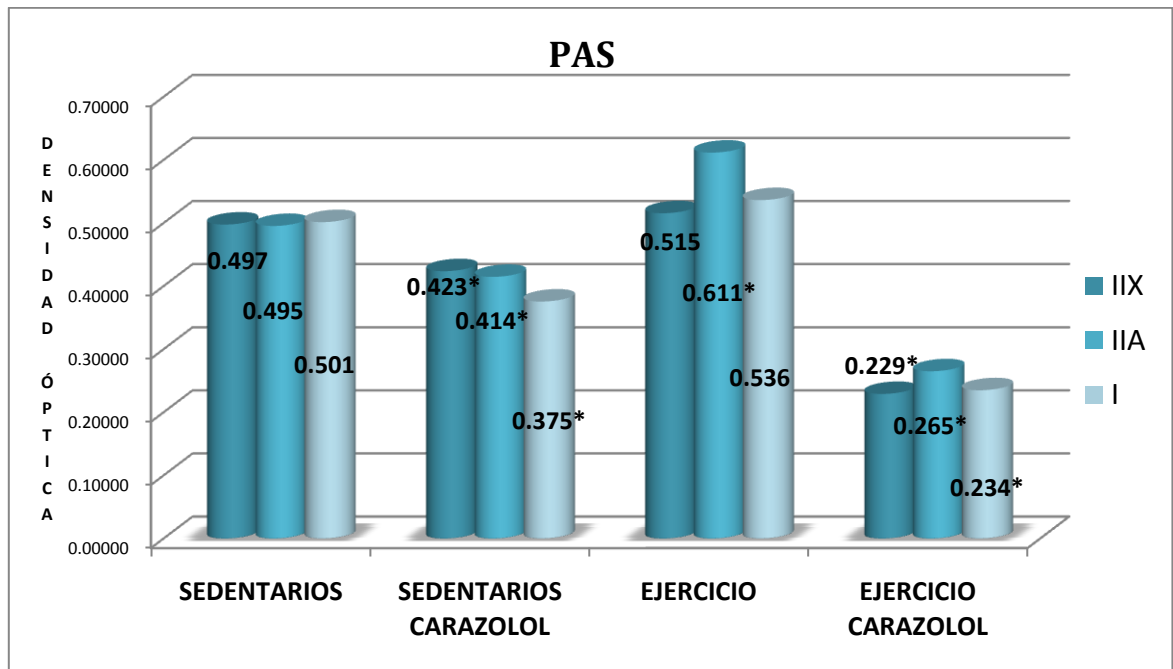


FIGURA 13. Efecto del carazolol sobre la cantidad de glucógeno almacenada en las fibras musculares de caballos sedentarios y de ejercicio. Medias calculadas de la densidad óptica, (\*) significativamente diferente.

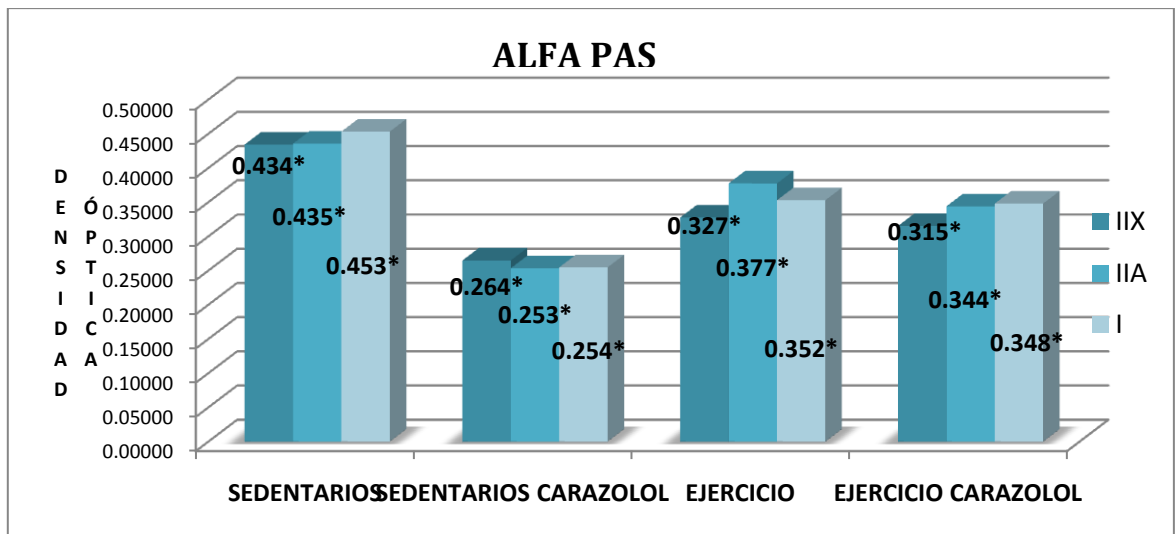


FIGURA 14. Efecto del carazolol sobre la cantidad de carbohidratos complejos en las fibras musculares de caballos sedentarios y de ejercicio. Medias calculadas de la densidad óptica, (\*) significativamente diferente.

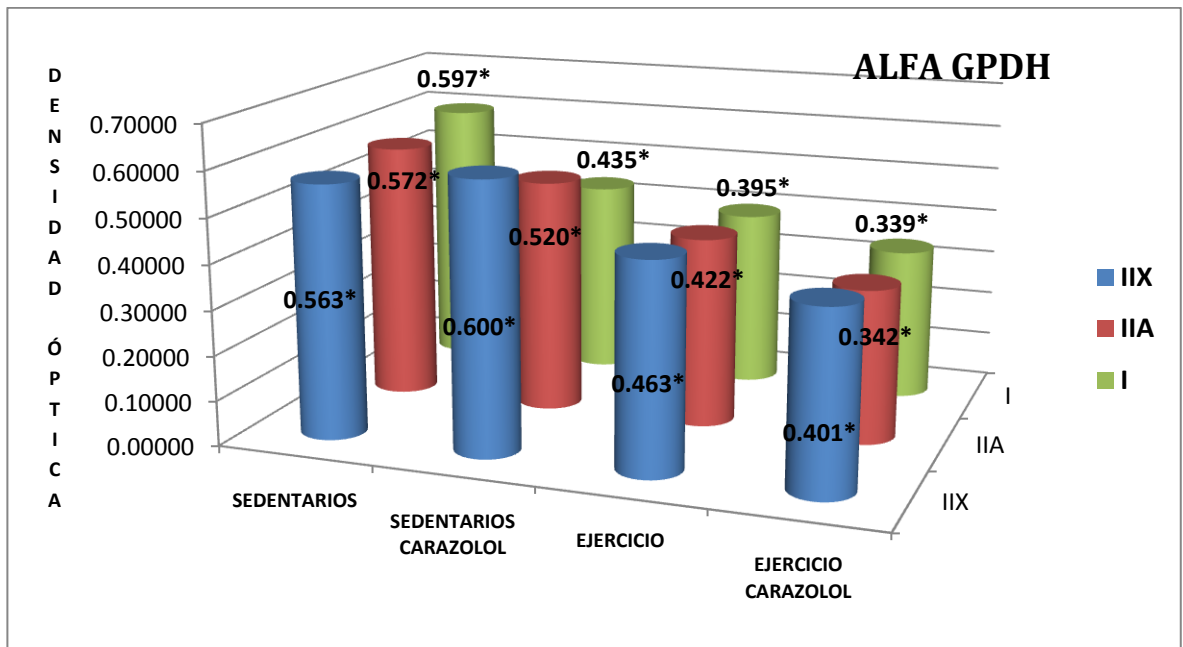


FIGURA 15. Efecto del carazolol sobre la cantidad de la enzima GPDH presente en las fibras musculares de caballos sedentarios y de ejercicio. Medias calculadas de la densidad óptica, (\*) significativamente diferente.

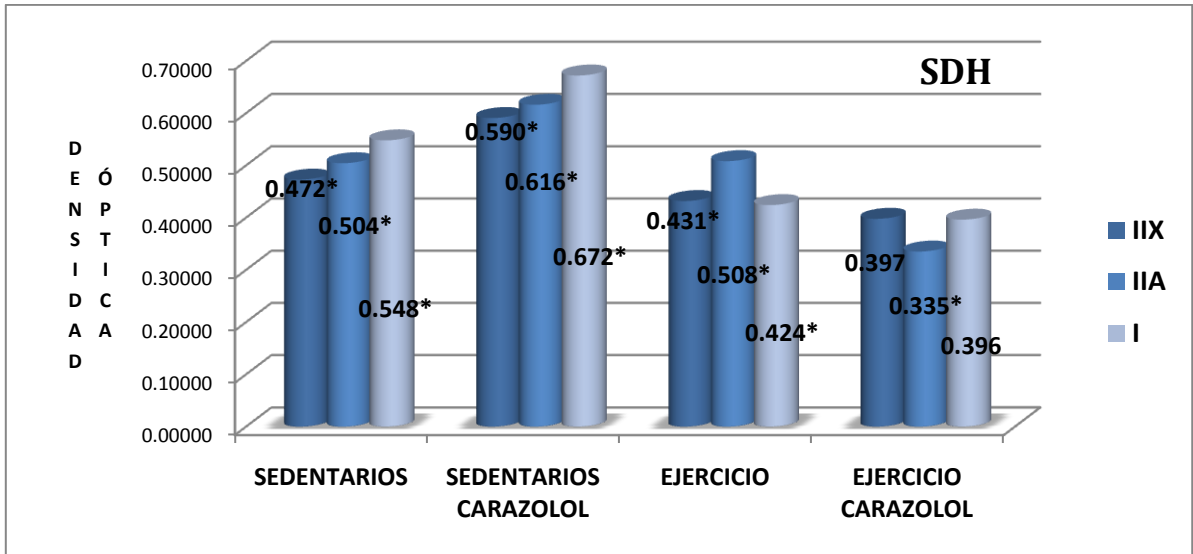


FIGURA 16. Efecto del carazolol sobre la cantidad enzima succinil deshidrogenasa presente en las fibras musculares de caballos sedentarios y de ejercicio. Medias calculadas de la densidad óptica, (\*) significativamente diferente.



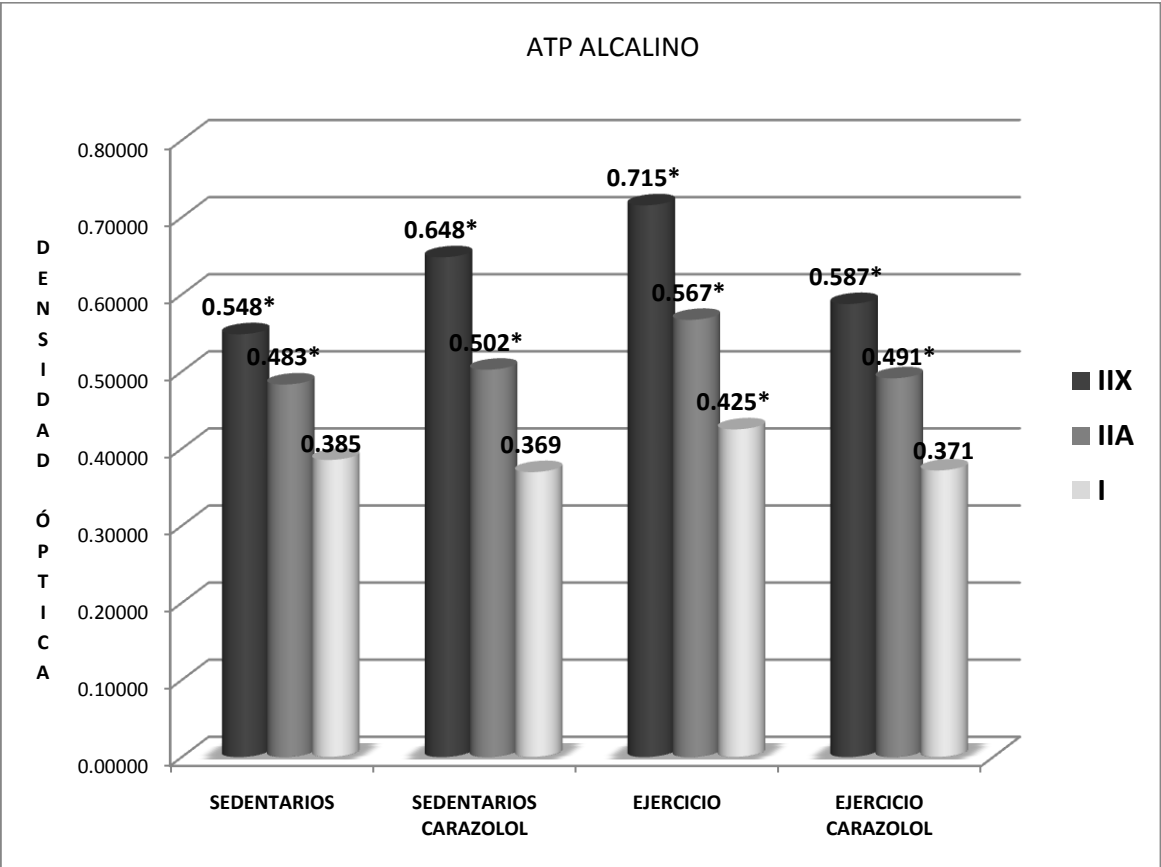


FIGURA 17. Efecto del carazolol sobre la cantidad de ATP ciclasa presente en las fibras musculares de caballos sedentarios y de ejercicio. Medias calculadas de la densidad óptica, (\*) significativamente diferente.

CUADRO 5. CAMBIOS SIGNIFICATIVOS ENTRE LOS GRUPOS CONTROL Y LOS TRATADOS

TIPO CELULAR	SEDENTARIOS VS EJERCICIO			SEDENTARIOS VS SEDENTARIOS CARAZOLOL			EJERCICIO VS EJERCICIO CARAZOLOL		
	IIX	IIA	I	IIX	IIA	I	IIX	IIA	I
% CELULAR	↓ 13.53 %	↑ 6.96 %	↑ 6.58 %	=	=	=	↑ 6.51 %	↑ 6.39 %	↓ 12.91 %
AREA	=	↑ 20.6 %	=	↓ 51.86 %	↓ 48.12 %	↓ 33.89%	=	↓ 17.45 %	=
NUCLEOS	↓ 0.9 N	=	↓ 1 N	=	=	=	↑ 1.3 N	↑ 0.6 N	↑ 0.8 N
CAPILARES	↑ 2.42 CAP	↑ 2.88 CAP	↑ 2.23 CAP	↑ 0.82 CAP	↑ 0.84 CAP	↑ 1.09 CAP	↓ 0.63 CAP	↓ 0.87	↓ 0.93 CAP
PAS	=	↑ 18.98%	=	↓ 14.88 %	↓ 15.35 %	↓ 25.14 %	↓ 55.53%	↓ 56.62 %	↓ 56.34 %
ALFA PAS	↓ 24.65 %	↓ 13.33	↓ 22.29 %	↓ 39.17 %	↓ 41.83 %	↓ 43.92 %	=	↓ 8.75 %	=
ALFA GPDH	↓ 17.76 %	↓ 26.22 %	↓ 33.83 %	↑ 6.16 %	↓ 9.09 %	↓ 27.13 %	↓ 13.39 %	↓ 18.95 %	↓ 14.17 %
SDH	↓ 8.68 %	=	↓ 22.62%	↑ 20 %	↑ 18.18 %	↑ 18.45 %	=	↓ 34.05 %	=
ATP ALCALINO	↑ 23.35	↓ 14.81 %	=	↓ 15.43	=	=	=	↓ 13.40 %	=

Este cuadro nos muestra los cambios significativos entre los grupos ejercicio y sedentarios, sedentarios contra sedentarios carazolol y ejercicio contra ejercicio carazolol para los grupos celulares IIX, IIA Y I, en cada una de las tinciones realizadas para este análisis. (↑) aumento significativo,(↓) disminución significativa, (=) no hay cambios significativos.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 1948, 153(3):586-600.
2. Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. *Molecular Biology of the Cell* . Fifth Edition Garland
3. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2<sup>nd</sup> edition *Br J Pharmacol.* 2007, 150 (1): 1–168 Mersmann, 1998;
4. Andersen JL, Schiaffino S. Mismatch between myosin heavy chain mRNA and protein distribution in human skeletal muscle fibres. *Am J Physiol.* 1997, 272 (41): 1181-1889
5. Andersen P, Henriksson J. Capillary supply of the quadriceps muscle in man: adaptative response to exercise. *J Physiol.* 1977, 270; 677-690
6. Andrews FM, Reed SM, Johnson GC. Muscle biopsy in the horse: its indications, techniques and complications. 1997. *Vet Med N Am Equine Pract* 4:357-265.
7. Asheim A, Knudsen O, Lindholm A, Rülcker C, Saltin B. Heart rates and blood lactate concentrations of standard bred horses during training and racing. *J Am Vet Med Assoc.* 1970, 1;157(3):304-12
8. Ashmore, C. R., & Doerr, L. Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Experimental Neurology.* 1971, 31, 408–418
9. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.* 2002, 416: 337–339.
10. Barrey E, Valette JP, Jouglin M, Blouin C, Langlois. Heritability of percentage of fast myosin heavy chains in skeletal muscles and relationship with performance. *Equine Vet J Suppl.* 1999, 30:289-292.
11. Berchtold MW, Brinkmeir H, Müntener M Calcium ion inskeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev.* 2000, 80:1215-1265.
12. Bergstrom J. Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinicalresearch. *Scand J Clin Lab Invest.* 1975, 35(7):609-16.

13. Blanco CE, Sieck GC, Edgerton VR. Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres. *Histochem J.* 1988, 20: 230-243.
14. Blanco CE, Sieck GC, Edgerton VR. Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres. *Histochem J.* 1988, 20:230-243
15. Board M, Doyle P, Cawthorne MA. BRL37344, but not CGP12177, stimulates fuel oxidation by soleus muscle in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2000, 406: 33–40.
16. Booth FW, Baldwin KM. Muscle plasticity: energy demand and supply processes. In: Rowell LB, Shepherd JT (eds) *Handbook of physiology.* American Physiological Society. Bethesda, Md. 1996, 1075–1123
17. Bottinelli R, Canepari M, Reggiani C, Stienen G. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J. Physiol.* 1994, 481: 663-675
18. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fibers types: how many and what kind?. *Arch Neurol.* 1970, 23:341-349.
19. Byrem TM, Beermann DH, Robinson TF. The beta-agonist cimaterol directly enhances chronic protein accretion in skeletal muscle. *J Anim Sci.* 1998 Apr; 76(4):988-989.
20. Chamberlain PD, Jennings KH, Paul F, Cordell J, Berry A, Holmes SD. The tissue distribution of the human  $\beta_3$ -adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the  $\beta_3$ -adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999, 23: 1057–1065.
21. Christensen L, Strange L. Universal immunoperoxidase staining protocol to optimize the use of polyclonal and monoclonal antibodies. *J Histotechnol.* 1987, 10: 11-15
22. Costill B, O'donnell SR, Wanstall JC. A comparison of the selectivity of carazolol with that of other  $\beta_2$ -adrenoceptor antagonists. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983; 35: 590–592.
23. Delahaut P, Brasseur PY, Dubois M. Multiresidue method for the detection of tranquillizers, xylazine, and a beta-blocker in animal production by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2004, 29;1054(1-2):373-8

24. Dubowitz, V., Brooke, M.H.: Muscle biopsy : A modern approach. W.B. Saunders Co. Ltd. London. 1973; p: 5-73.
25. Dunnett M, Harris RC, Sewell DA. Taurine content and distribution in equine skeletal muscle. *Scand J Clin Lab Invest.* 1992, 52(7):725-30
26. Durrant ML, Garrow JS, Royston P, Stalley SF, Sunkin S, Warwick PM. Factors influencing the composition of the weight lost by obese patients on a reducing diet. *Br J Nutr.* 1980, 44(3):275-85.
27. Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ, Winter PD. Chronic effects of  $\beta_2$ -adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci Rep.* 1984, 4: 83-91.
28. Erzen I, Sirca A. The nonspecificity of the lead method for the histochemical demonstration of adenosine triphosphatases in human skeletal muscle fibres. *J Anat.* 1985,140 (1):13-23
29. Essen-Gustavsson B, Karlström K, Lindholm A. Fibre types enzyme activities and substrates utilization in skeletal muscles of horses competing in endurance rides, *Equine Vet. J.* 1984, 16: 197-202
30. Essen-Gustavsson, B. Activity –and inactivity– related muscle adaptation in the animal kingdom. En: Saltin, B. (ed.). *Biochemistry of exercise VI.* Human Kinetic Publishers, Champaigne, IL. 1986, 435-444.
31. Essen-Gustavsson, B. Training effect on skeletal muscle. En P. KALLINGS (ed.) *Proceedings of the International Conference on Equine Sport Medicine.* Almquist and Wiksell Tryckeri, Uppsala, 1984: 18-23
32. Favier, R., D. Desplanches, H. Hoppeler, E. Caceres,A. Grunenfelder, H. Koubi, M. Leuenberger, B. Sempore, L. Tischer, and H. Spielvogel. Hormonal and metabolic adjustments during exercise in hypoxia or normoxia in highland natives. *J. Appl. Physiol* 1996, 80(2): 632-637,
33. Fisher MH, Amend AM, Bach TJ, Barker JM, Brady EJ, Candelore MR, Carroll D, Cascieri MA, Chiu S-HL, Deng L, Forrest MJ, Hegarty-Friscino B, Guan X-M, Hom GJ, Hutchins JE, Kelly LJ, Mathvink RJ, Metzger JM, Miller RR, Ok HO, Parmee ER, Saperstein R, Strader

- CD, Stearns RA, Thompson GM, Tota L, Vicario PP, Weber AE, Woods JW, Wyvratt MJ, Zafian PT, MacIntyre DE. A selective human h3 adrenergic receptor agonist increases metabolic rate in Rhesus monkeys. *J. Clin. Invest.* 1998, 101: 2387– 2393.
34. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D and Le Marec H. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest.* 1996, 98: 556-562
35. Gerhardt C, Gros J, Strosberg Ad, Issad T. Stimulation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2Pathway by Human Beta-3 Adrenergic Receptor: New Pharmacological Profile and Mechanism of Activation. *MOLECULAR PHARMACOLOGY.* 1999, 55:255–262.
36. Gregory NG, Wilkins LJ. The effect of carazolol on the cardiovascular responses to adrenaline in stress sensitive pigs. *Vet Res Commun.* 1982; 5(3):277-83.
37. 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.
38. Guth L, Samaha F. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* 1970, 28, 365-367.
39. Guth L, Samaha FJ. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp Neurol.* 1969, 28:365-366.
40. Holtz W, Schmidt-Baulain R, Meyer H, Welp C. Control of prostaglandin-induced parturition in sows by injection of the  $\beta$ -adrenergic blocking agent carazolol or carazolol and oxytocin. *J. Anim. Sci.* 1990, 12: 3967
41. Hoppeler H, Vogt M. Hypoxia training for sea level performance - Training high - living low. *Adv Exp Med Biol.* 2001, 502: 61-73.
42. Hyypää, S., Räsänen, L. and Pösö, R. Resynthesis of glycogen in skeletal muscle from Standardbred trotters after repeated bouts of exercise. *Am J Vet Res.* 1997, 58, 162-166.

43. Innis RB, Corrêa FM, Synder SH. Carazolol, an extremely potent beta-adrenergic blocker: binding to beta-receptors in brain membranes. *Life Sci.* 1979, 11(24):2255-64.
44. 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, 13(4):350-5.
45. Kayser B, Hoppeler H, Desplanches D, Marconi C, Broers B, Cerretelli P. Muscle ultrastructure and biochemistry of lowland Tibetans. *Journal of Applied Physiology.* 1996, 81, (1) 419-425.
46. Keul, J., P. Schmidt and A. Neiss. Treatment of arterial hypertension. Efficacy and tolerance of the beta receptor blocker Carazolol in a field study, *Muench. Med. Wochenschr.* 1985, 25,664.
47. Killeffer J, Koohmaraie M. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence, analysis, and steady-state mRNA expression. *J Anim Sci.* 1994, 72: 606-614.
48. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* 1994 8;372(6506):546-8
49. Kuo, Chia-Hua, Zhenping Ding, and John L. Ivy. Interaction of exercise training and clenbuterol on GLUT-4 protein in muscle of obese Zucker rats. *Am. J. Physiol.* 1996. 271: 847-854,
50. Lidner A, Serpil Dag, Silvia Marti-Korff, Quiroz Rothe E, JLL Rivero, and Drommer W. Effects of repeated biopsying on muscle tissue in horses. *Equine Vet J.* 2002, 34(6):619-24.
51. Linnane L, Serrano AL, Rivero JLL. Distribution of fast myosin heavy chain-based muscle fibres in the gluteus medius of untrained horses: mismatch between antigenic and ATPase determinants. 1999. *J Anat* 194:363-372.
52. Lopéz 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

53. Manalan AS, Besch HR, Watanabe AM. Characterization of [3H](+/-)carazolol binding to beta adrenergic receptors. Application to study of beta-adrenergic receptor subtypes in canine ventricular myocardium und lung. *Circ. Res.* 1982, 49; 326-336.
54. Martin BB Jr, Reef VB, Parente EJ, Sage AD. Causes of poor performance of horses during training, racing, or showing: 348 cases (1992-1996). *J Am Vet Med Assoc.* 2000, 15;216(4):554-8.
55. Mejean A, Guillaume JL, Strosberg AD; Carazolol: a potent, selective beta 3-adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 1995, 291(3):359-66.
56. Miller, J.W., Farid, N.A., Johnson, R.D., Smith, B.P., Dananberg, J. Stimulation of energy expenditure by LY377604, a h3-adrenergic receptor agonist with h1/2-antagonist properties, in healthy male subjects. *Obes. Res.* 1999, 7 ( 1), 121S.
57. Miyata H, Sugiura T, Kai M, Hiraga A, Tokuriki M. Muscle adaptation of Thoroughbred racehorses trained on a flat or sloped track. *Am J Vet Res.*1999, 60; 1536–1539.
58. Mlekoday JA, Mickelson JR, Valberg SJ, Horton JH, Gallant EM, Thompson LV. Calcium sensitivity of force production and myofibrillar ATPase activity in muscles from Thoroughbreds with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Am J Vet Res.* 2001, 62(10):1647-52.
59. Moloney AP, Allen P, Joseph RL, Tarrant PV, Convey EM. Carcass and meat quality of finishing Friesian steers fed the  $\beta$ -adrenergic agonist L-644,969. *Meat Sci.* 1994, 38: 419-432.
60. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biology International.*1996, 20, 15-27.
61. Morris TH, Birnbaumer L, Kaumann AJ. High affinity of carozolol for beta-adrenoceptors coupled to the adenylyl cyclase in ventricular myocardium of kitten and *Xenopus laevis*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*1978, 303(3):295-297.
62. Morris EA, Seeherman HJ. Clinical evaluation of poor performance in the racehorse: the results of 275 evaluations. *Equine Vet J.* 1991, 23(3):169-74.



63. Nibbering PH, Marijnene JGJ, Raap AK, Leijh PCJ, Furth van R. Quantitative study of enzyme immunocytochemical reactions performed with enzyme conjugates immobilized on nitrocellulose. *Histochemistry*. 1986, 84: 538-543.
64. Persson SGB, Essén-Gustavsson B, Lindholm A. Energy profile and the locomotor patterns of trotting on an inclined treadmill. In: Equine exercise physiology 3, Persson SGB, Lindholm A, Jeffcott LB (Eds.), ICEEP Publications, Davis, California, 1991, 231-238.
65. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA, Stempel KE. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*. 1972, 4;11(14):2627-33.
66. Pette D, Staron S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibres. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1990 116:1-76
67. Pietri-Rouxel F, Strosberg AD Pharmacological characteristics and species-related variations of beta 3-adrenergic receptors. *Fundam Clin Pharmacol*. 1995, 9(3):211-8.
68. Quiroz Rothe E, López R. Co-ordinated expression of contractile and non-contractile features of control equine muscle fibre types characterised by immunostaining of myosin heavy chains. *Histochemistry and Cell Biology*. 2001, 116: 299-312
69. Quiroz Rothe E. Bases celulares de la respuesta muscular del caballo frente al entrenamiento y a miopatías primarias y neurógenicas. JL Rivero(ed). Déposito Legal.CO-1108-2003. ISBN 84-688-2599-9. 2003.
70. Reggiani C, Mascarello F. fibre types identification and functional characterization in adult livestock animals. *Physiology Genetics and meat quality*. edit MFW PASMEEverts HP CABI publishing. 2004, 539-563.
71. Rivero JL, Serrano AL, Barrey E, Valette JP, Jouglin M. Analysis of myosin heavy chains at the protein level in horse skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 1999, 20(2):211-21
72. Romano C, Yang WL, O'Malley KL. Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem*. 1996, 271:28612-28616

73. Rome LC, Sosnicki AA, Goble DO. Maximum velocity of shortening of three fibre types from horse soleus muscle: implications for scaling with body size. *J Physiol.* 1990, 431:173-85.
74. Rose AJ, Broholm C, Kiillerich K, Finn SG, Proud CG, Rider MH, Richter EA & Kiens B. *J Physiol.* 2005 569, 223–228.
75. Sacks, D. Roy, R. Architectural, histochemical, and contractile characteristics of a unique biarticular muscle: the cat semitendinosus. *J of Neurophysiology.* 1982, 48 (1):192-201.
76. Schiaffino S, Reggiani C Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996, 76:371-373.
77. Serrano AL, Quiroz Rothe E And López Rivero JI (2000). Early and longterm changes of equine skeletal muscle in response to endurance training and detraining. *Pflügers. Arch.-Eur J Physiol* 441:263-274.
78. Sigel P, Pette D. Intracellular localization of glycogenolytic and glycolytic enzymes in white and red rabbit skeletal muscle: a gel film method for coupled enzyme reactions in histochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1969, 17(4):225-37.
79. Sinha AK, Rose RJ, Pozgaj Y, Hoh JFY. Indirect myosin immunocyto-chemistry for the identification of fibre types in equine skeletal muscle. *Res. Vet. Sci.* 1992, 53: 25-31.
80. Strosberg AD. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:421-50
81. Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. Muscle fiber types and function. *Curr Opin Rheumatol.* 1993, 5:695-705
82. 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.* 2003, 23(4): 139-144
83. Valberg S, Essen-Gustavsson B, Lindholm A, Persson S. Energy metabolism in relation to skeletal muscle fibre properties during treadmill exercise. *Equine Vet. J.* 1985, 17: 439-444.

84. Valderrama ME, Quiroz-Rothe E, Ocampo CL. Efecto del carazolol en el músculo esquelético del caballo: observaciones preliminares. XXXI Congreso de la Asociación de Médicos Veterinarios especialistas en equinos, Puerto Vallarta, 2009.
85. Weibel ER. Stereological methods I: practical methods for biological morphometry. London, UK: Academic Press, 1989; 9, 62.
86. Wells WA, Rainer RO, Memoli VA. Equipment, standardization, and application of image processing. Am. J. Clin. Pathol.1993, 99: 4856.
87. Williams RS, Neuffer PD. Regulation of gene expression in skeletal muscle by contractile activity. In: Handbook of physiology: integration of motor, circulatory, respiratory and metabolic control during exercise. Rowell LB, Shepherd JT (Eds.), American Physiological Society, Bethesda, Md,1996, 1124-1150.