



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**ADAPTACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO
AL ENTRENAMIENTO DE MODERADA INTENSIDAD
EN EL CABALLO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

**PRESENTA
JOSÉ LUIS LEÓN LINARES**

TUTOR: EUGENIO QUIROZ ROTHE

**COMITÉ TUTORAL:
ALICIA ORTEGA AGUILAR
LUIS OCAMPO CAMBEROS**

MÉXICO, D. F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 mis padres Celso León y Francisca Linares: *Papa gracias por hacer de mi una persona de bien de la cual se sienten orgullosos, les debo todo. Mamá de ti aprendí las cosas más hermosas de la vida como fue el amor, la lucha diaria pero más que nada la humildad y servicio hacia los demás, no hay palabras para decirte cuanto te quiero, solo una que engloba todas "Te Amo Mamá" .*

A mi esposa M. Guadalupe Núñez *por todo ese amor y la paciencia que me has tenido todos estos años, en el amor, en la tristeza, en el trabajo, gracias amor.*

A mi hijo L. Francisco *llegaste en el momento correcto a mi vida y le diste la chispa para hacer de este hombre el hombre más feliz del universo, eres lo que soñé siempre te amo hijo de mi vida.*

A mis hermanos: N. Andrea, Martín, Carlos, Juan *gracias por todo el apoyo y confianza, pero más que nada por hacer de mi vida la más feliz*

A Sr. Francisco y Sra. Graciela: *Gracias por permitirme encontrar en su regazo el calor de familia que deje lejos, y encontrar en sus hijos los amigos y los hermanos que en ausencia no tuve.*

A Aurora León *por ser en mi infancia mi alma gemela, descansa en paz hermanita.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo económico otorgado.

Dr. Eugenio Quiroz R: Gracias por su apoyo, consejos y dirección de esta tesis.

Dra. Alicia Ortega: Gracias por brindarme la confianza para saltar los contratiempos en este trabajo, por todos los momentos en que estuvo ahí para decirme qué camino tomar.

Dr. Luis Ocampo: Por sus acertadas discusiones en el desarrollo de este trabajo

M en C. Moisés Eduardo Valderrama: Por el apoyo en todo momento en el desarrollo de este trabajo y por mostrarme la dirección a seguir.

A los doctores: Dr. Alejandro Rodríguez, Dra. Gabriela López, Dra. María Masri, Dr. Ricardo Zamudio, Dr. Valdez, Dr. Núñez, Dr. Sigler: por que de todos ustedes aprendí tantas cosas que no podría describir con palabras, gracias.

Al Dr. León Ramírez: con que palabras alcanzaría a darte las gracias por lo enseñado, pero más que nada porque me impulsaste a hacer cosas más allá de lo que puede hacer una persona común, basado en la confianza. Gracias maestro y amigo.

Al Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ-UNAM: Gracias a todo el personal por la ayuda recibida y por permitirme utilizar sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo.

A la Secretaría de la Defensa Nacional - Campo Deportivo del Estado Mayor Presidencial: Al MVZ Teniente Coronel Felipe Cortez y al MVZ Jorge Fuentes por todas las facilidades prestadas para obtener el material de estudio así como las instalaciones.

Al Agrupamiento Montado de la Policía del distrito federal: Gracias por abrirnos las puertas al inicio de este trabajo.

Al departamento de Técnicas Histológicas de la Facultad de Medicina: En especial a la Técnica Verónica Rodríguez, por la disponibilidad prestada y a todo su equipo de trabajo por hacer menos pesadas las horas que pase ahí.

Al departamento de Medicina, Cirugía y zootecnia para équidos: Por abrirme las puertas a mi llegada a la ciudad de México y convertirse mi casa por tanto tiempo, y principalmente por formarme en esta área tan hermosa que es la Medicina en equinos, eternamente agradecido, gracias a todos y cada uno que conforman dicho departamento.

A mis amigos: Oscar O., Pollo, Verito, Ramés, Paola, Martin, Darío, Carlos, Omar, Dr. Main, Luis A., Germán y todos los que compartieron el mismo lugar en diferente tiempo 2005-2011.

ÍNDICE

I. LISTA DE IMÁGENES Y FIGURAS	I
II. LISTA DE GRÁFICAS	II
III. LISTA DE CUADROS	III
IV. RESUMEN	IV
V. ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Origen del músculo esquelético	2
1.2 Bases morfológicas del músculo esquelético	3
1.3 Contracción muscular	5
1.4 Metabolismo muscular	6
1.5 Clasificación del músculo esquelético en el caballo	7
1.6 Adaptación muscular al entrenamiento	10
2. JUSTIFICACIÓN	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Animales	18
5.2 Entrenamiento	18
5.3 Toma de muestra	19
5.4 Evaluación morfológica e identificación de enzimas	20
5.5 Análisis de imágenes	21
5.6 Análisis estadístico	22
6. RESULTADOS	23
7. DISCUSIÓN	32
8. CONCLUSIONES	38
9. ANEXOS	39
10. BIBLIOGRAFIA	44

I. LISTA DE IMÁGENES Y FIGURAS

- Figura 1. Intervalo entre las dos tomas de biopsias con respecto al entrenamiento.
- Imagen 1. Medición de áreas transversas en la tinción HE.
- Imagen 2. Tinción de la ATPasa miofibrilar a un pH de 10.
- Imagen 3. Tinción de la ATPasa miofibrilar a un pH de 4.5.
- Imagen 4. Batería de tinciones correspondiente a la primera biopsia
- Imagen 5. Batería de tinciones correspondiente a la segunda biopsia

II. LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1. Porcentaje de población fibrilar antes y después del entrenamiento.
- Gráfica 2. Área de la población celular antes y después del entrenamiento.
- Gráfica 3. Efecto del entrenamiento sobre la densidad nuclear en las fibras musculares, antes y después del entrenamiento.
- Gráfica 4. Efecto del entrenamiento sobre la densidad capilar en las células musculares, antes y después del entrenamiento.
- Gráfica 6. Efecto del entrenamiento sobre la cantidad de glucógeno almacenado en las células musculares, antes y después del entrenamiento.
- Gráfica 7. Efecto del entrenamiento sobre la cantidad de carbohidratos complejos en las células musculares, antes y después del entrenamiento.
- Gráfica 8. Efecto del entrenamiento sobre la cantidad de enzima succinil deshidrogenasa presente en las células musculares antes y después del entrenamiento.
- Gráfica 9. Efecto del entrenamiento sobre la cantidad de enzima GPDH presente en las células musculares, antes y después del entrenamiento.
- Gráfica 10. Efecto del entrenamiento sobre la enzima ATPasa miofibrilar presente en las células musculares, antes y después del entrenamiento.

III. LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Resumen de las principales características de los diferentes tipos de fibras músculo esqueléticas (López Rivero, 1988).
- Cuadro 2. Esquema del entrenamiento utilizado por doce semanas.
- Cuadro 3 Registro de los datos del análisis estadístico, por tinción y fibra muscular, considerando su error estándar = Std Error y su media de la biopsia A
- Cuadro 4. Registro de los datos del análisis estadístico, por tinción y fibra muscular, considerando su error estándar = Std Error y su media de la biopsia B.
- Cuadro 5. Cambios significativos entre la primera y la segunda biopsia.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio es comprender los mecanismos de adaptación celular y molecular del músculo esquelético frente a estímulos fisiológicos como ejercicio, entrenamiento y desentrenamiento, utilizando al caballo deportivo como modelo. El estímulo capaz de inducir la plasticidad y potencial de adaptación se basa en la facultad de lograr un incremento en el volumen de oxígeno circulante, disminución del umbral anaerobio, incremento del número de vasos sanguíneos y modificaciones del tipo fibrilar, así como de los sustratos energéticos y mitocondriales, promoviendo cambios en la actividad metabólica y contráctil de las fibras musculares. Se evaluó el perfil músculo esquelético de caballos Warmblood, determinando el efecto del entrenamiento sobre las características contráctiles del músculo (velocidad de contracción), metabolismo (capacidad oxidativa, glucolítica, contenido de glucógeno) y morfológicas (área transversal, densidad nuclear y densidad capilar), al inicio y final de un entrenamiento de moderada intensidad. Se utilizó un grupo de caballos adultos (n=11) de los cuales se obtuvieron dos biopsias musculares por medio de la técnica de aguja percutánea, al inicio del entrenamiento (semana 1) y al final del entrenamiento (semana 12), las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido, se utilizó una batería de tinciones histológicas e histoquímicas. Se empleó un análisis de imagen morfométrico J Proplus V. 1.4.1 y estadística descriptiva. Después del periodo de entrenamiento se encontraron cambios en el porcentaje de células tipo IIX incrementándose de 34% a 35.7%, y en las células IIA de 37% a 39.4%, mientras que el tipo celular I, presentó una disminución de 28.5% a 24.8%, resaltando significativamente el cambio metabólico y estructural en los tipos fibrilares IIX y IIA, favoreciendo la capacidad oxidativa y reduciendo el metabolismo anaeróbico.

Palabras clave: entrenamiento, adaptación, plasticidad, estímulo.

ABSTRACT

The purpose of this review is to present current understanding mechanisms of cellular and molecular adaptation of skeletal muscle to physiological stimuli, exercise, training and detraining, using sporting horse as a model. Stimulus capable of inducing muscle plasticity and potential adaptation is based on the power to achieve an increase in circulation volume oxygen, decrease of anaerobic threshold, increase in number of blood vessels and modifications of fibrillary type, as well as the energy and mitochondrial substrates, promoting changes in metabolic and contractile activity of muscle fibers. For this was assessed profile skeletal muscle of horses Warmblood, determining the effect on the contractile characteristics of muscle (contractile velocity), metabolism (oxidative capacity, glycolitic, content of glycogen) and morphological (fibrillary transverse area, nuclear density and capillary density) at the beginning and end of a moderate-intensity workout. We used a group of adult horses (n = 11) of which were two muscle biopsies through percutaneous needling at the beginning of the training (week 1) and at the end of the training (week 12), samples were frozen in liquid nitrogen; to be later processed using a battery of stains histological and histochemical. An analysis of image was employment Morphometric J Proplus V. 1.4.1 and method of descriptive statistics. After trained period were found changes in the percentage of type IIX cells increasing from 34% to 35.7%, and the type IIA cells from 37% to 39.4%, while the type I cell, presented a reduction of 28.5% to 24.8%, significantly emphasizing the metabolic and structural change in fiber types IIX and IIA, favoring the oxidative capacity and reducing anaerobic metabolism.

Keywords: Training, adaptation, plasticity, stimulus.

INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético es el tejido corporal que integra entre otras, a las funciones de sostén y locomoción del individuo (Leisson, 2008). El músculo del mamífero consta de aproximadamente, 75% de agua, 18-22% de proteína, 1% de carbohidratos y 1% de minerales, con un contenido lipídico variable. En el equino la musculatura esquelética está muy desarrollada y adaptada a realizar ajustes ante el potencial atlético de este animal (Premiani, 1957). A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los mamíferos, cuyo peso corporal está compuesto por un 30-40% de la masa muscular, en el caballo adulto el 53 % del su peso vivo corresponde a músculo (Rivero & Piercy, 2007). La composición del músculo esquelético, 90 % corresponden a fibras musculares y 10 % a tejido adiposo, nervioso, etc. El músculo esquelético maduro es un tejido marcadamente adaptable, demostrando una significativa regeneración, hipertrofia y adaptación metabólica con un tipo de ejercicio regular (Goldspink, 1998). La habilidad individual para mantener un promedio alto de fuerza o velocidad, depende del rango y eficiencia con la cual la energía química es transformada en energía mecánica, para producir la contracción muscular (Hansen, 2005). El entrenamiento induce múltiples adaptaciones fisiológicas y metabólicas; entre las cuales hay un incremento en el rango de producción de energía por vías oxidativas y una disminución en las vías anaerobias, minimiza los disturbios celulares, incrementa la economía del movimiento y aumenta la resistencia muscular a la fatiga (Billat, 2002). La importancia del entrenamiento está dada por que es una oportunidad única para estudiar como las diferentes funciones son reguladas e integradas para que se dé una adaptación a este tipo de estímulo (Fluck, 2006).

1.1. ORIGEN DEL MÚSCULO

Un músculo se compone de centenares de células musculares individuales; estos miocitos se especializan en generar fuerza y producir la contracción (Serratos y Duran, 2009). La miofibra muscular se origina durante la vida embrionaria, con la aparición de dos o tres oleadas sucesivas de mioblastos, que constituyen el origen de los diferentes tipos de fibras musculares (Picard, 2002).

La población muscular se origina en las somitas (compartimentos del mesodermo paraxial, en la forma rostral-caudal, durante la progresión temprana de todos los vertebrados en estado embrionario) (Alberts, 2010). La maquinaria para que se de la miogénesis está constituida por el dermomiótomo, el cual forma un epitelio de la parte dorsal en la somita temprana; este se divide en epiaxial y hipoaxial, el patrón de innervación de los músculos deriva de este sitio. Los músculos craneales y de los miembros son controlados por procesos regulatorios, que resultan de la expresión de receptores de asa base hélix, que contienen factores miogénicos reguladores (FMR), que dan origen y diferenciación hacia los mioblastos (Vega y Zaráin Herzberg, 2000). Los FMR son responsables de la dirección de expresión de genes que son requeridos para generar las propiedades contráctiles de un músculo esquelético maduro, estos genes actúan en paralelo con receptores pares de factores de transcripción Pax3 y PAX7 en los diferentes pasos de la miogénesis en estado embrionario y adulto (Bryson-Richardson y Currie, 2008). En ausencia de factores inhibidores de la transcripción, Pax3 activa el gen MyoD, el cual forma los músculo epiaxiales, MyoD es inducido por la proteína Myf5 en la formación del músculo esquelético, MyoD establece una cascada temporal de activación de genes, que pueden unirse a regiones específicas del ADN donde activan propiamente los genes de expresión, que actúan como cofactores para MyoD, uniéndose a otro grupo de potencializadores, P38 y Mef2; MyoD y Mef2 activan a un segundo grupo de genes para la diferenciación del músculo (Alberts, 2010). Los mioblastos son los precursores de las células musculares, estos se fusionan cuando salen de su ciclo celular de proliferación; bajo el efecto particular de factores de crecimiento, en este momento estos mioblastos están

diferenciándose (Rudnicki y Jaenish, 1995). Cuando los niveles de los factores caen, los mioblastos dejan de dividirse, agregan fibronectina dentro de su matriz extracelular y unen $\alpha\beta 1$ integrina, el receptor principal de fibronectina (Tickle, 2003). La unión integrina-fibronectina es crítica para la línea de diferenciación de mioblasto a fibra muscular. Después de la unión de mioblastos, hay una alineación de los mismos, en forma de cadenas alineadas, esto mediado por glicoproteínas de la membrana, como son algunas cadherinas y moléculas de adhesión celular (MAC) (Sadler, 2008). Después de esto ocurre una fusión de membranas, mediada por una metaloproteinasa llamada meltrina. MyoD y Myf5 continúan activos para la especificación del linaje de las fibras musculares; la miogenina aparece para mediar la diferenciación de las mismas fibras musculares. Con la fusión del mioblastos, se forma el miotubo, que secreta interleucina 4, que recluta a otros mioblastos que continúan libres para fusionarse y así formar el miotubo maduro y después a la miofibrilla propiamente dicha (Gilbert, 1997).

1.2 BASES MORFOLOGICAS DEL MÚSCULO ESQUELETICO

La célula muscular es una fibra de 10 a 100 μm de diámetro. La membrana celular de la fibra muscular se denomina sarcolema y rodea al sarcoplasma (citoplasma), los núcleos se ubican en la periferia, en una posición subsarcolémica. Las mitocondrias en las fibras musculares pueden ser encontradas en la periferia del músculo, bajo el sarcolema y son conocidas como mitocondrias subsarcolemales; así también hay mitocondrias en el centro de las fibras musculares; entre las miofibrillas y estas son designadas como mitocondrias intermiofibrilares (Hoppeler *et al*, 1985). Esta condición nos indica que tan pronto es generado el ATP, durante la fosforilación oxidativa, está listo para ser consumido por la maquinaria contráctil (Serratos y Duran, 2009). Diversas proteínas incluidas la mioglobina, las enzimas glucolíticas y varios filamentos intermedios están distribuidos en todo el citoplasma (Rivero y Piercy, 2007). El retículo sarcoplasmico es un sistema de membranas intercelulares, ubicado entre las miofibrillas en dirección longitudinal y guarda una gran cantidad de Ca^{++} ATPasa, la proteína calsecuestrina y los canales liberadores de calcio, ubicados en las cisternas terminales, adyacentes a los túbulos T. Este último es una invaginación tubular del sarcoplasma. Cada

miofibrilla está dividida por las denominadas bandas Z en unidades de unos 2 μ m de longitud denominados sarcómeros, en donde se encuentran distribuida de manera ordenada los filamentos gruesos y delgados (Silbernagl y Despopoulos, 2001).

Los filamentos que integran los sarcómeros son los elementos decisivos en la contracción muscular, ya que poseen las proteínas fundamentales (actina y miosina) para el desarrollo de este proceso (Kent y Carr, 2001). Los filamentos gruesos están integrados mayoritariamente por miosina (200 moléculas por filamento). Además de ésta existen otras proteínas, como la conectina que une el filamento grueso a la línea Z colaborando de esta forma al mantenimiento de una disposición ordenada de los filamentos y la proteína C, cuya función no es clara (Melvin, 1999).

La miosina representa el 60 % del componente proteico total de la miofibrilla. Es una proteína compleja (480.000 K Daltons de peso molecular) formada por seis cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras (Alberts, 2010).

Cada cadena pesada presenta una estructura alfa-helicoidal que termina en un extremo globular. Las dos cadenas pesadas se entrelazan formando una espiral en uno de cuyos extremos, proyectándose lateralmente, se encuentra la doble cabeza globular. Las cadenas ligeras se asocian de dos en dos con el extremo globular de cada cadena pesada (Schiaffino y Reggiani, 1996).

La miosina tiene gran capacidad de hidrólisis del ATP produciendo energía (actividad ATPasa) y una gran afinidad por la Actina (constituyente de los filamentos finos). Estas características residen en la doble cabeza de la miosina. Las moléculas se orientan en direcciones opuestas (orientación bipolar) uniéndose a través de sus colas, mientras que las zonas que engloban a la doble cabeza y a la unión con la cola se proyectan lateralmente. Los filamentos finos están integrados por una proteína contráctil, la Actina, y dos proteínas reguladoras, Tropomiosina y Troponina. Cada monómero de Actina G presenta un lugar de

unión activo a través del cual los puentes de unión de los Filamentos Gruesos interaccionan con los Filamentos Finos. La Actina se caracteriza por unirse estrechamente a la Miosina (Gordon, 2000).

La tropomiosina es una proteína alargada (40nm de longitud) que está formada por dos cadenas polipeptídicas de estructura alfa-helicoidal enrolladas entre sí. El filamento fino de tropomiosina se inserta a lo largo del surco, que se forma entre las cadenas que integran la Actina F, abarcando el espacio comprendido por siete monómeros de Actina G (Melvin, 1999). Cuando el músculo está en reposo, la disposición de la Tropomiosina en el Filamento Fino impide la interacción de la Actina y la Miosina (Muñiz, 2005).

La troponina es una proteína globular que está integrada por tres subunidades: T, C e I. La troponina I (Troponina inhibitoria) actúa en reposo, inhibiendo la unión de la actina con los “Puentes de Unión” de la miosina, debido a que impide a la tropomiosina dejar libres los lugares de unión de la actina. La troponina T, sirve de anclaje a la tropomiosina y la troponina C, es la que une el calcio y permite que ocurra la reacción entre la miosina y la tropomiosina (Fox, 2008).

1.3 CONTRACCIÓN MUSCULAR

Miosina se une perpendicularmente con la actina. Como consecuencia de la unión la miosina sufre un cambio de conformación que se traduce en un giro de la cabeza (aproximadamente 45°), el cual crea un impulso mecánico que tira del filamento de actina llevándolo hacia el centro del sarcómero generando una tensión o fuerza (Cunningham y Klein, 2009). La energía necesaria para que se produzca el impulso se encuentra almacenada en la cabeza de la miosina, mediante la hidrólisis del ATP, la unión con la actina se libera. Así mismo, la unión de la actina con la miosina produce la liberación del ADP y del Pi (monofosfato), que permanecían unidos a la cabeza de la Miosina, permitiendo que una nueva molécula de ATP se adhiera a la cabeza (Hill *et al.*, 2008). La unión de ATP produce la ruptura del enlace, separándose la Actina de la Miosina, transformándose esta en Miosina “desactivada” (Posterino, 2001). Esta separación

permite que el ATP unido a la cabeza sea de nuevo hidrolizado, con lo cual la Miosina vuelve a “activarse” y estar dispuesta para unirse de nuevo a otro lugar de la actina más alejado del anterior, de este modo el ciclo vuelve a comenzar y el filamento fino es desplazado nuevamente hacia el centro del sarcómero (Colville, 2002). La fuerza o tensión que desarrolla el músculo va a estar relacionada con el número de enlaces que se forman entre la actina y la miosina (Nardin, 2001).

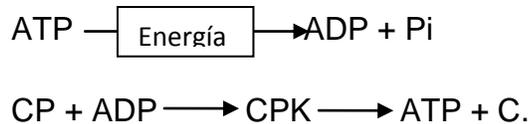
1.4 METABOLISMO MUSCULAR

Es importante considerar que el grado de actividad del músculo determinará el predominio de un metabolismo aeróbico o anaeróbico (Boffi, 2007). Durante el reposo o en ejercicio moderado intervienen mecanismos aeróbicos con gran eficiencia en la producción de ATP (Hill y cols, 2008). A medida que se va intensificando un déficit en el aporte de oxígeno, como consecuencia de una mayor actividad, se producen una serie de mecanismos anaeróbicos que deprimen la eficiencia en la producción de ATP y tiene como producto final el ácido láctico (Legido y Calderón, 2005).

Cuando la energía se usa para el movimiento; sólo un 25% de esta energía genera energía mecánica, el resto se pierde en forma de calor, durante el movimiento, se produce el desdoblamiento de gran número de moléculas de ATP. El músculo esquelético contiene solo el ATP necesario para mantener una contracción por unas pocos segundos, todas las formas de trabajo muscular, dependen de la correcta generación de ATP mientras el músculo trabaja. El trabajo muscular depende estrictamente del rango con que es aportado el ATP para el aparato contráctil (Hill *et al.*, 2008).

El músculo esquelético de los vertebrados tiene tres mecanismos bioquímicos para producir ATP:

- 1.- Contiene además del ATP, un compuesto de alta energía, denominado fosfocreatina (Randall, 2002). La concentración de fosfocreatina es mas de tres veces superior a la del ATP y representa una reserva de fosfato de alta energía que puede cederse de manera directa al ADP (Fox, 2008).



2.- La glucólisis anaerobia permite la producción neta de cantidades menores de enlaces de fosfato de alta energía (Barret, 2000). Esta forma de producción de energía no necesita del oxígeno y utiliza al glucógeno como combustible, aparte de producir ATP, genera también ácido láctico que es retenido en el cuerpo para ser metabolizado después (Hill y cols, 2008). Es de destacar que el gradual acúmulo de ácido láctico intracelular y la concomitante disminución del pH resulta en una inhibición enzimática con una menor producción de ATP (Fox, 2008). La escisión enzimática del glucógeno en ácido pirúvico y ácido láctico libera energía para convertir ADP en ATP y reconstituir también a la fosfocreatina (Guyton, 2007).

3.- El metabolismo oxidativo necesita del oxígeno y puede utilizar a tres clases de combustible: glucosa, ácidos grasos y proteínas (Hill *et al.* 2008). Esto supone combinar el oxígeno con los productos finales de la glucólisis para liberar ATP, más del 95 % de toda la energía que utilizan los músculos a largo plazo en el proceso de contracción sostenida procede de esta fuente. Durante el ejercicio ligero los músculos utilizan lípidos en forma de ácidos grasos libres como fuente energética, a medida que aumenta el ejercicio, los lípidos no pueden aportar la energía necesaria, a la velocidad requerida, por lo que los carbohidratos se vuelven el principal componente en la generación de energía (Barret, 2010).

1.5 CLASIFICACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELETICO EN EL EQUINO.

Las fibras del músculo esquelético representan una población heterogénea, que difieren en sus características de metabolismo energético, propiedades contráctiles y en su morfología (Dubowitz y Pearse, 1960). En el músculo esquelético se expresan diferentes tipos de fibras, caracterizadas por especificidad de cadenas pesadas de miosina, estas cadenas determinan la importancia funcional de sus propiedades como son la velocidad de contracción y la resistencia a la fatiga (Billat, 2002). Estos dos parámetros están íntimamente

relacionados entre sí, ya que el tipo de miosina o isoforma de las cadenas pesadas presentes en la fibra muscular es el principal determinante de la velocidad de contracción de la célula, debido a que la miosina es el motor de la contracción (Bottinelli y Reggiani, 2000). En el caballo solo tres de estas cadenas puras y dos híbridas han sido caracterizadas en el músculo por electroforesis (Serrano *et al.*, 2000) y por Inmunohistoquímica; estas han sido designadas I, II y IIX, para mantener la nomenclatura consistente entre especies, porque sus características antigénicas y electroforéticas son consistentes u homólogas con las isoformas de rata. Esta división de tipos de fibras ya había sido clasificada desde hace mas de 25 años, pero por métodos histoquímicos; por medio de la ATPasa miofibrilar (mATPasa), que se basa en la desnaturalización alcalina y ácida de la fibra muscular (Linnane, 1999). Mediante el proceso de clasificación celular, ya sea por medios de inmunohistoquímica, histoquímica o por electroforesis, se identificaron fibras que no tenían una definición hacia un patrón preestablecido, a las que les llamaron fibras híbridas, ya que expresaban 2 cadenas pesadas de miosina, quedando de forma intermedia entre las fibras llamadas puras o que expresaban una sola isoforma de estas cadenas pesadas de miosina (Pette y Staron, 1997). Estas fibras musculares híbridas pueden explicar en parte, que las cadenas pesadas de miosina híbridas representan la dominancia del fenotipo bioquímico en el músculo esquelético, que posiblemente antes de ser híbridas, tenían características puras (Bortolotto *et al*, 2000), lo cual quiere decir, que hay una dominancia de una isoforma de cadena pesada de miosina sobre otra, que bien si esta en menor cantidad, es suficiente para llegar a manifestarse en dicha fibra, dejando u ocupando el intervalo que queda entre las fibras puras. Las fibras que coexpresan cadenas pesadas de miosina en isoformas de contracción lenta o de contracción rápida, son claros ejemplos de cadenas pesadas de miosina híbridas y se han encontrado que se presentan de manera normal en el músculo esquelético de los mamíferos (Stephenson, 2001). La proporción de cadenas pesadas de miosina híbridas y su complejidad molecular es alta en músculos que

Cuadro 1. Resumen de las principales características de los diferentes tipos de fibras músculo esqueléticas (López Rivero, 1988).

CARACTERÍSTICAS	TIPO DE FIBRAS			Reporta
	I	IIA	IIX	
a) HISTOLÓGICAS				
Tamaño	Pequeño	Intermedio	Grande	Barlow y col. 1984
Color	Rojo	Intermedio	Blanco	Schuber 1971/72
Densidad capilar	Alta	Intermedio	Bajo	Snow 1983a
Mitocondrias	Numerosas	Numerosas y periféricas	Escasas	Hoppeler y col. 1983
Densidad vol. Mitocondrial	5.60%	6.70%	0.7 - 3.25 %	Hoppeler y col. 1983
b) FISIOLÓGICAS				
Velocidad de contracción	Lenta	Rápida		Howald 1982
Tiempo de contracción	99-140 ms	40-88 ms		Garnett y col., 1979
Vel. De relajación	Lenta	Rápida		Wiles y col., 1979
Máxima tensión	12 g	25 g		Gernett y col., 1979
Vel. De conducción de membrana	2.5 m/s	5.4 m/s		Howald, 1982
Elasticidad	Alta	Baja		Barlow y col., 1982
Fuerza/ intensidad	Lento/Baja	Rápido desarrollo		Barlow y col., 1984
Función	Aplomos y resistencia	Propulsión y velocidad		Aberle y col., 1976
c) METABÓLICAS				
Cap. Oxidativa	Alta	Intermedio	Baja	Snow 1983
Cap. Glucolítica	Baja	Intermedio	Alta	Valverg y col., 1985
Con. Glucógeno	Intermedio	Alta	Alta	Andreas/Spurgeon, 1985
Con. Miosin ATPasa	Baja	Alta	Alta	Rose, 1985
Ac. Glucógeno sintetasa	Baja	Alta	Alta	Snow y col., 1982b
Act. Lactato deshidrogenasa	Baja	Alta	Alta	Valverg/Eszen G., 1985.
Act. AGPDH	Baja	Baja	Alta	V.D. Hoven y col., 1985
Act. Citrato sintetasa (CS)	Baja	Alta	Baja	Valverg/Eszen G., 1985.
d) HISTOQUÍMICAS				
Act. NADH-TR	Alta	Intermedia	Baja	Eszen y col. 1980
Act. Succinato deshidrogenasa (SDH)	Alta	Intermedia	Baja	Snow/Guy 1980

pesadas de miosina híbridas y su complejidad molecular es alta en músculos que están en transformación molecular y funcional en comparación con músculos normales o en reposo (Pette, 1985). Las isoformas de cadenas pesadas de miosina encontradas en una simple fibra, bajo condiciones drásticas, induce conversión entre tipos de fibras (Aigner y Pette, 1992). Está bien documentado que las fibras musculares híbridas resultan de la transición de la expresión de cadenas pesadas de miosina, siguiendo una vía obligatoria en un sentido dependiente del tipo de estímulo I-I+IIA-IIA-IIAX-IIX, demostrando la gran plasticidad del músculo esquelético (Picard, 2002).

1.6 ADAPTACIÓN MUSCULAR AL ENTRENAMIENTO EN EL CABALLO

El entrenamiento es el más potente estímulo para inducir la remodelación celular del músculo esquelético, pero esto depende del tipo y duración del ejercicio para poder apreciar los cambios en el tamaño de las fibras musculares, así como el incremento en la actividad contráctil y metabólica de dichas fibras musculares (Booth y Baldwin, 1996). Las respuestas al entrenamiento de resistencia están directamente relacionadas con la cantidad de trabajo y son correspondientes a la actividad realizada en correspondencia a los patrones musculares. La clave de un programa de entrenamiento son: la intensidad y la frecuencia con que se realice este, la suma de estos factores nos provoca un estímulo que modifica el tejido muscular (Gollnick *et al.*, 1971).

Este tipo de entrenamiento provoca un incremento en la densidad mitocondrial, aumento en la capilaridad vascular, aumento en la actividad enzimática y en el intercambio de oxígeno; así también promueve una transición del tipo de fibra II al tipo de fibra I, con lo cual hay una disminución de las fibras rápidas y un incremento sustancial de las lentas. Entrenamientos prolongados de este tipo induce un declive en el porcentaje de fibras tipo IIX y un incremento en la densidad de los tipos fibrilares tipo I y II (Serrano et al, 2000; Linnane et al., 1999; Baldwin y Haddad, 2002). Se ha visto que las fibras de contracción rápida (IIX), son las más vulnerables al daño, en comparación a sus contrapartes, las fibras de contracción lenta. Hay denervación focal de las fibras durante el ejercicio, siendo reversible y

acompañado de una regeneración axonal en las terminales neuromusculares (Seene y Umnova, 1998). Este daño local que se da a nivel neuromuscular, podría ser el factor activador de las células satélite, dado a que bajo este tipo de entrenamiento el número de estas se incrementa en ambos tipos de fibras (Seene *et al*, 2005). Otro tipo de cambio ocurre sin diferencia del tipo de fibra a nivel ultraestructural; ocurre como una lesión a los filamentos de actina y miosina; así también hay una disrupción en la continuidad de los discos Z a nivel del sarcómero, destrucción de mitocondrias y dilatación de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico y del sistema de túbulos T (Takekura and Yoshiota, 1990). Este cambio podría explicar el aumento en la densidad nuclear, como una necesidad de reparación mediante la síntesis de nueva proteína, llevando esto a una adaptación gradual al entrenamiento, mediante una compensación integrada de la célula. La remodelación muscular envuelve la remoción de proteína vieja y su reemplazo por proteína nueva (Booth *et al*, 1996). El contenido de proteína en el músculo y la calidad de esta, depende de la integridad del proceso de remodelación del músculo durante el entrenamiento (Seene *et al.*, 2005).

El caballo presenta un alto potencial en cuanto a la plasticidad muscular frente al entrenamiento, a nivel estructural y funcional de las miofibrillas. Estos son considerablemente heterogéneos; esta diversidad refleja una especialización funcional y una plasticidad adaptativa, la cual se ha estudiado exhaustivamente durante los últimos 30 años (Rivero y Piercy, 2007; Serrano *et al.*, 2000). Las adaptaciones que requieren un largo periodo de tiempo, ocurren independientemente de las respuestas fisiológicas inmediatas a los ejercicios aeróbicos o anaeróbicos. Dependiendo de la naturaleza del estímulo, la respuesta adaptativa puede tomar diferentes formas: 1) Hipertrofia, cuando las fibras aumentan su tamaño, pero mantiene su estructura basal y sus propiedades fisiológicas y bioquímicas. 2) Remodelación sin hipertrofia, en esta las fibras no aumentan de tamaño pero sufren modificaciones de sus características estructurales y enzimáticas notorias. 3) Respuesta mixta, cuando se combinan las dos primeras (Valverg, 1986; Boffi, 2007; Quiroz y Rivero, 2001). El fortalecimiento del músculo esquelético durante las primeras semanas de un programa de

entrenamiento, se debe primordialmente a factores de tipo nervioso. Entre estos factores se encuentra la mayor eficiencia del reclutamiento y de la sincronización de las unidades motoras, el aumento de la coordinación intermuscular, la disminución de la sensibilidad de los órganos tendinosos de Golgi y los efectos de aprendizaje motor. La hipertrofia muscular y el incremento de fuerza, que le acompañan aparecen más tarde, entre las 6-8 semanas de iniciado el entrenamiento (Escamilla y Wickham, 2004). Una notable etapa de la plasticidad del músculo esquelético es la especificidad de respuesta a un estímulo. Cuando decrece la carga y el número de contracciones, aparece el estímulo para que se den las adaptaciones del músculo esquelético. Un entrenamiento de moderada intensidad puede causar una diferenciación de las fibras musculares, con tendencia hacia un fenotipo resistente a la fatiga (Fluck, 2006).

Tal vez la más precoz y común adaptación muscular al entrenamiento es el incremento de la actividad enzimática del metabolismo anaeróbico, como las enzimas del ciclo de Krebs, de la cadena respiratoria y de la β - oxidación de ácidos grasos (Rivero *et al.*, 1995). Estos cambios están asociados con el aumento de tamaño y de la densidad mitocondrial, pues está demostrado un incremento en la actividad enzimática en el músculo, después de un periodo de entrenamiento de alta intensidad causan cambios cualitativos y estructurales de la mitocondria (Hoppeler y Flück, 2002). Holloszy (1967) demostró que un incremento en la capacidad para capturar oxígeno, por parte de la mitocondria es proporcional, a un incremento de las enzimas mitocondriales en el músculo esquelético de ratas estudiadas después del ejercicio; también se ha asumido que una hipoxia muscular local, puede ser un estímulo disparador para llevar a cabo las adaptaciones mitocondriales en el tejido muscular. El ejercicio en periodos cortos de hipoxia ofrece un proceso interesante, como potencial para modular los estímulos metabólicos sobre las fibras musculares (Bernardi, 1999). Hay evidencia que sugiere que la cantidad de calcio acumulado en el sarcolema, producto de la actividad contráctil y la cantidad de ATP celular, provoca una adaptación mitocondrial dentro de un programa de entrenamiento de moderada intensidad (Li *et al*, 1977). El entrenamiento de resistencia en una apropiada aplicación, en base

a tiempo y a la intensidad moderada puede producir un incremento en el contenido de enzimas mitocondriales, en un rango de 50-100% dentro de un periodo de seis semanas (Adhietty, *et al* 2009). Debe de pasar este periodo de tiempo para que se mantenga estable la adaptación mitocondrial y pueda ser evaluado en las fibras musculares. Dentro de este periodo de tiempo la cronología de los cambios depende del tipo de fibra reclutada, así también de la frecuencia, intensidad y duración de las sesiones de ejercicio. Una aplicación de este hecho es que los programas de entrenamiento de resistencia deben de ser desarrollados de tal manera que permitan el reclutamiento de unidades motoras fatigables que contengan fibras IIB si es que queremos conseguir adaptaciones mitocondriales en estas fibras (Kayar, *et al.* 2001). El entrenamiento también ha demostrado un leve incremento en los depósitos de glucógeno almacenado en los músculos, que podría estar asociado con la reducción de enzimas glucolíticas, ya que la capacidad para movilizar glucógeno endógeno, está parcialmente influenciado por la actividad de las enzimas anaeróbicas dentro de las fibras musculares (Boffi, 2008). Con esta adaptación mitocondrial, en donde el fenotipo fibrilar es alterado, el músculo es llevado a adquirir características de músculo altamente oxidativo, atenuando la serie de respuestas metabólicas del ejercicio (por ejemplo, la producción y remoción del ácido láctico), obteniendo como resultado una capacidad mejorada en cuanto el rendimiento en el ejercicio de resistencia.

La angiogénesis es descrita como la formación de nuevos capilares, emergiendo de vasos ya existentes. La capilaridad en músculos activos se ve incrementada bajo un proceso de entrenamiento. Dado que un programa de entrenamiento altera la morfología muscular (hipertrofia), el aporte sanguíneo inicial es insuficiente, para los nuevos requerimientos del músculo en renovación (Tesch *et al*, 1984). Rivero *et al* (1995) demostraron que el número de capilares, adyacentes a las fibras tipo I, se incrementó en respuesta a tres meses de entrenamiento, utilizando como modelo al caballo. El alargamiento de un vaso ocurre como respuesta a una elevación de la presión interna, con el consecuente aumento de estrés de las paredes del vaso, así como la elevación de la presión en la superficie de las células endoteliales (Koffi *et al*, 1999). El proceso de angiogénesis depende

de que el estrés estimule diversos factores (VEGF2 (factor vasculo-endotelial de crecimiento tipo 2), integrina $\alpha\beta_3$, angiopoyetina Tie2, y la óxido nítrico sintetasa) (Prior *et al*, 2004; Ferrara *et al.*, 2003). La angiogénesis regional en músculos activos, se da por dos vías: por intususcepción y por ramificación de los vasos existentes. La primera es por activación de los factores mencionados anteriormente en las células endoteliales, exponiendo a un nuevo cordón de un capilar existente; dado que hay crecimiento de las células musculares hay más espacio entre los capilares originales, siendo este nuevo el que va a cubrir el espacio formado, por medio de una migración hasta llegar a formar una red de nuevos capilares. En la segunda vía, el vaso original se parte por la mitad dando como resultado un bifurcación en forma de "Y" con una dirección envolvente al músculo (Prior, 2004; Alberts, 2010). El aumento en la densidad capilar, reduce la distancia entre la sangre y las células musculares, con lo cual se incrementa el intercambio de gases y metabolitos. La superficie disponible para el intercambio se ve incrementada, con mas capilares por volumen de tejido, mas sangre puede fluir por la intrincada cama o red de capilares por unidad de tiempo, donde el tiempo de tránsito se ve disminuido, dando un intercambio de sustratos más rápido y más completo (Wagner, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

La mayor parte de los protocolos de entrenamiento, no son totalmente objetivos en cuanto a la duración del entrenamiento y la correlación que guarda con la plasticidad muscular, dentro del perfil atlético del caballo, este trabajo permitirá conocer como se desenvuelven las características metabólicas, morfológicas y contráctiles de los músculos, bajo entrenamiento.

3. HIPÓTESIS

Confirmar como el ejercicio controlado provoca estímulos fisiológicos a nivel celular, que generan plasticidad morfológica, metabólica y contráctil de las fibras musculares.

4. OBJETIVO GENERAL

Investigar en el plano celular la adaptación del músculo esquelético del caballo, frente al entrenamiento aeróbico-anaeróbico, mediante la evaluación del área, densidad nuclear, densidad capilar, metabolismo glucolítico y oxidativo en las fibras musculares, con el fin de evaluar las adaptaciones celulares a dicho entrenamiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer el efecto del entrenamiento sobre la actividad de la enzima ATPasa miofibrilar
2. Determinar el efecto del entrenamiento sobre el área transversal, número de capilares y el número proporcional de núcleos para cada fibra muscular.
3. Determinar la transición de fibras hacia un fenotipo más oxidativo mediante el análisis de las enzimas succinil deshidrogenasa (SDH) y la enzima alfa glicerofosfato deshidrogenasa (α GDPH), después un periodo de entrenamiento.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Campo Deportivo del Estado Mayor Presidencial y en las instalaciones del Departamento del Distrito Federal, en el agrupamiento de la policía montada. Se utilizaron a 11 caballos adultos de ambos sexos, con un rango de edad de 6 y 12 años y un peso promedio de 450- 550 kg diagnosticados clínicamente sanos por los médicos veterinarios a cargo de cada dependencia.

Los 11 caballos fueron sometidos a un entrenamiento de moderada intensidad por doce semanas (Cuadro 2), siendo muestreados con una biopsia muscular a la semana 1 y en la semana 12, (biopsia inicial y biopsia final) (Figura 1).

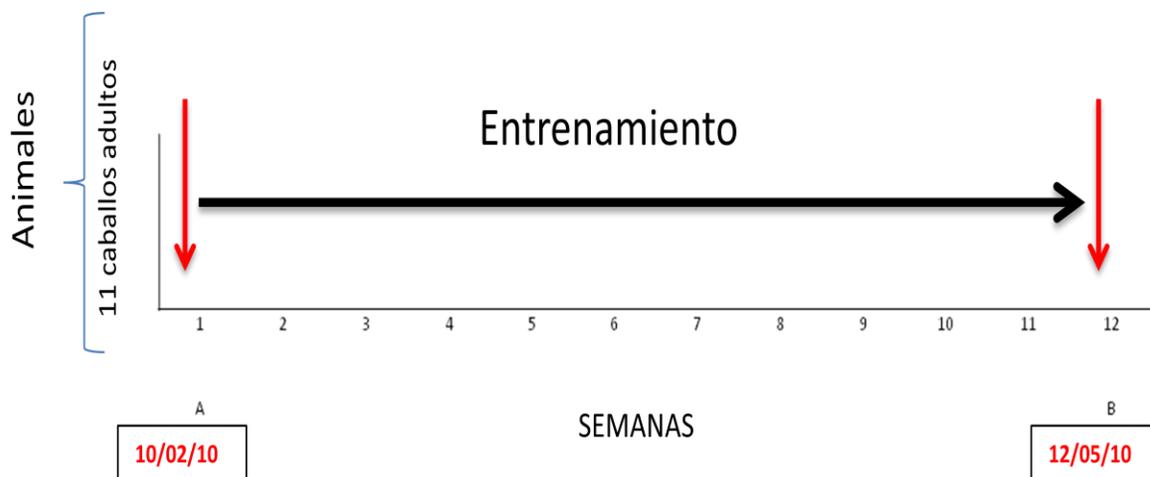


Fig. 1 Intervalo entre las dos tomas de biopsia con respecto al entrenamiento

5.2 Entrenamiento

El protocolo de entrenamiento utilizado en los caballos, constó de un proceso integrado por microciclos de entrenamiento, que se mantuvieron constantes. Estos microciclos compuestos por una carga de trabajo moderado aeróbico, en una secuencia 6/1, donde se trabajan seis días y se descansa uno a la semana, la secuencia del entrenamiento se alternó de tal forma que el ejercicio fuesen varias

disciplinas. El entrenamiento se aplicó por un periodo de una hora diaria, por el lapso de doce semanas.

DIA	ACTIVIDAD	TIEMPO
LUNES	DESCANSO	
MARTES	PASEO MONTADO DIF. TIPO DE TERRENO ADIESTRAMIENTO	30/30 MIN (1 HORA)
MÍERCOLES	RECORRIDO DE SALTO	1HORA
JUEVES	RECORRIDO DE SALTO	1 HORA
VIERNES	PASEO MONTADO DIF. TIPO DE TERRENO ADIESTRAMIENTO	30/30 MIN (1 HORA)
SÁBADO	ADIESTRAMIENTO	1 HORA
DOMINGO	PASEO MONTADO	1HORA

Cuadro 2. Esquema del entrenamiento utilizado por doce semanas

5.3 Toma de muestra

Las biopsias musculares (con un intervalo de 12 semanas), se obtuvieron del músculo glúteo medio; este músculo fue seleccionado por la alta expresión de los tres tipos de fibras musculares y por su participación activa durante cualquier etapa de la locomoción. Antes de obtener las biopsias se realizó un rasurado de 1 cm cuadrado aproximadamente, así como su correspondiente antisepsia con yodo espuma y alcohol. Se infiltraron subcutáneamente 3 ml de Lidocaína al 2% (Pisacaina ®, Lab. PISA), posteriormente se incidió con una hoja (navaja) de bisturí del número 15, 0.5 cm en línea vertical al glúteo, incidiendo solo piel y fascia muscular, la línea de incisión se realizó dividiendo en tres la distancia del ilion al isquion, dejando esta incisión en el último tercio. La profundidad a la que se obtuvo la biopsia fue a 6 cm aproximadamente, obteniendo 0.5 g de tejido muscular, aproximadamente, en cada caballo, guardando uniformidad ya que se tomó con la misma aguja (similar a la utilizada por Bergström, de fabricación nacional, con un diámetro de 6 mm) en todos los casos. Una vez obtenidas las muestras se identificaron, posteriormente se aplicó O.C.T. (Tissue-Tek, Lab. Sakura, Japon) como protector celular, y se sumergieron en Isopentano (N-

Metilbutano) como amortiguador de la temperatura del nitrógeno, disminuyendo así los artefactos por estallamiento en las fibras musculares (Cameron-Smith, 2009). Las muestras se conservaron en congelación a -170°C , hasta su posterior corte y tinción con técnicas histológicas e histoquímicas. Para su corte se utilizó un criostato 2800 Frigocut (Reichert-Jung, Leica, Bensheim, Alemania), a -25°C ; siendo cortadas en secciones transversales y con diferentes grosores (10,12 y 14 μm), y montadas en laminillas tratadas con Poli-L-Lisina, colocando tres cortes secuenciados por laminilla, dentro de una relación de laminillas numeradas de acuerdo a una batería de tinciones, hasta su procesamiento individual.

5.4 Evaluación morfológica e identificación de enzimas.

La evaluación morfológica e identificación de enzimas se realizó mediante tinciones histológicas e histoquímicas. Para la medición del área transversal (μm^2) y la cantidad de núcleos, se utilizó la tinción de Hematoxilina - eosina (HE) (Sida y col. 1995). El contenido de glucógeno y el número de capilares se midió por la tinción PAS (Per-yódica de Schiff), y de α -Amilasa PAS, respectivamente y se realizaron según la técnica descrita por Andersen y Henriksson (1977).

Los protocolos para las técnicas histoquímicas se encuentran ampliamente descritas (Brooke y Kaiser, 1970). La diferenciación de las fibras oxidativas se realizó, mediante la identificación de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH). La técnica que se utilizó fue la descrita por Nemeth y Pette (1981).

La capacidad glucolítica de las miofibrillas se midió, mediante la actividad de la enzima alfa-glicerofosfato deshidrogenasa (α GDPH), ya que es una de las principales enzimas involucradas en el metabolismo anaerobio y forma parte de la porción soluble de la celular. La actividad de la enzima α GDPH, se reveló con una tinción con tonalidad oscura, lo cual indica su precipitación catalizada por la enzima. Las modificaciones realizadas a esta técnica por Sigel y Pette (1969), permiten diferenciar las tonalidades de intensidad reactiva, en los tipos celulares I, IIA y IIX.

La velocidad de contracción fibrilar se determinó mediante la enzima mATPasa, en preincubaciones ácidas con un pH de 4.6; para visualizar la actividad enzimática se utilizó la técnica descrita por Sida y col. (1995), esta técnica nos permitió visualizar tres tipos celulares I, IIA y IIX; con capacidad oxidativa, mixta y glucolítica respectivamente (Pérez, 2010), concordando con lo publicado por López Rivero (1988).

5.5 Análisis de las imágenes

El proceso de análisis de los cortes teñidos por las técnicas histológicas e histoquímicas, comenzó mediante la captura de la imagen, mediante un microscopio óptico (Motic® Type BA200), adicionándole una cámara de alta resolución y una tarjeta gráfica. Las áreas analizadas estuvieron libres de artefactos, se contaron 50 fibras musculares por sección escogida, las células fueron numeradas de forma aleatoria y siempre fueron las mismas en cada tinción. Se estableció el área morfométrica transversal de las miofibras, obteniendo +/- 1000 μm^2 , con lo cual se determinaron las diferencias morfométricas para cada fibra como son: área transversal, densidad capilar y densidad nuclear, utilizando a la tinción HE y alfa amilasa PAS. Para determinar la actividad enzimática en las tinciones histoquímicas, se realizó por medio de densidad óptica, utilizando el programa comercial de análisis morfométrico Image J Proplus (V.1.4.1. para Windows vista/XP/Macintosh), se calibró el programa al valor de fondo blanco para cada tinción, considerándolo a éste como valor mínimo de cada muestra analizada. 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 cuantificación de reacciones colorimétricas permite identificar determinadas estructuras, establecen su número o área de tinción, así como su densidad óptica (píxeles). El análisis computarizado de imágenes es ideal para la cuantificación de reacciones estequiométricas (Wells, 1993).

5.6 Análisis estadístico

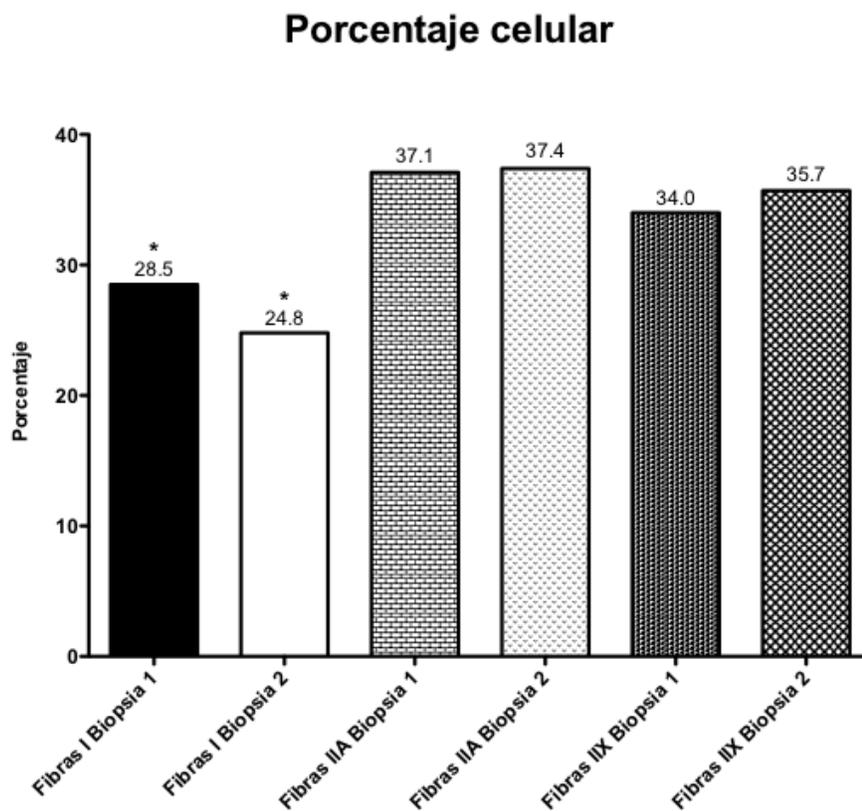
Se creó una base de datos, a partir del análisis por imagen, donde se analizaron 50 fibras musculares por biopsia y por cada caballo, cuidando rigurosamente que éstas fueran las mismas para cada tinción. Se realizaron los cálculos de estadística descriptiva, medias y errores estándar de la media; así como un análisis de datos categóricos para dos proporciones para la evaluación del área celular y un análisis de varianza sobre el efecto del entrenamiento. Se llevó a cabo un análisis de correlación entre el entrenamiento y las características celulares, valores de $P < 0.05$ se consideraran significativos. Los resultados se presentan con sus medias y sus errores estándar.

6. RESULTADOS

El porcentaje de células tipo I para la primera biopsia fue de 28.5%, para la segunda biopsia fue de 24.8%. Con una Z calculada de 2.22, se encontró que hay diferencia significativa con $P < 0.05$.

Para el porcentaje de células tipo IIA en la primera biopsia fue de 37.1%, para la segunda biopsia fue de 37.4%. Con una Z calculada de -1.239, se encontró que no hay diferencia significativa.

Para el porcentaje celular tipo IIX quedo así, para la primera biopsia fue de 34%, para la segunda biopsia fue de un 35.7%. Con una Z calculada de 0.792, se encontró que no hay diferencia significativa. (Gráfica 1).



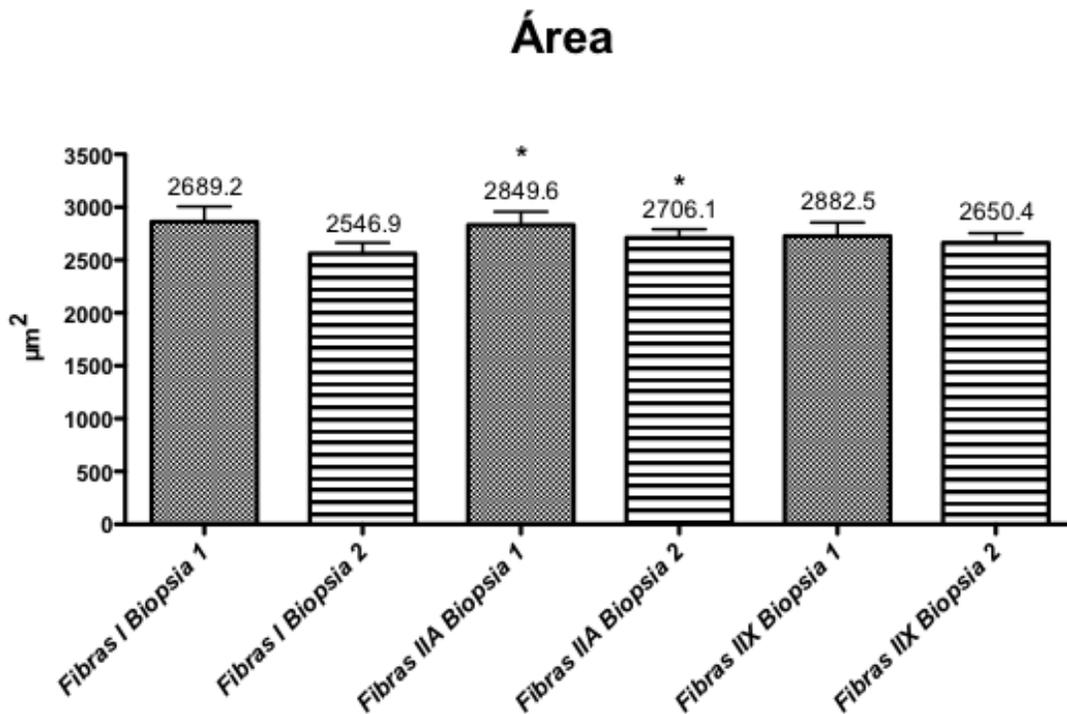
Gráfica 1. Porcentaje de población celular antes y después del entrenamiento, donde el tipo celular I, resulta significativamente diferente* $P < 0.05$.

Área

El área para el tipo fibrilar I, su media fue de $2689.2 \mu\text{m}^2$, con un error estándar de 117.2 para la primera biopsia, para segunda biopsia presenta una media de $2546.9 \mu\text{m}^2$, con un error estándar de 140.5. No hubo diferencia significativa $P = 0.3385$ entre las dos biopsias para este tipo celular.

El área para el tipo fibrilar IIA tiene una media de $2849.6 \mu\text{m}^2$ con un error estándar de 104.2 para la primera biopsia, para la segunda biopsia su media es de $2706.19 \mu\text{m}^2$, con un error estándar de 99.9. Hubo diferencia significativa $P = 0.0048$ por el efecto del entrenamiento $\pm 129 \mu\text{m}^2$ entre las dos biopsias para este tipo celular.

El área para el tipo fibrilar IIX tiene una media de $2882.5 \mu\text{m}^2$ y una desviación estándar de 129.6, para la primera biopsia; para la segunda biopsia, tiene una media de $2650.4 \mu\text{m}^2$ y una error estándar de 114.7. No hubo diferencia significativa $P = 0.0700$ entre las dos biopsias para este tipo celular. (Gráfica 2)



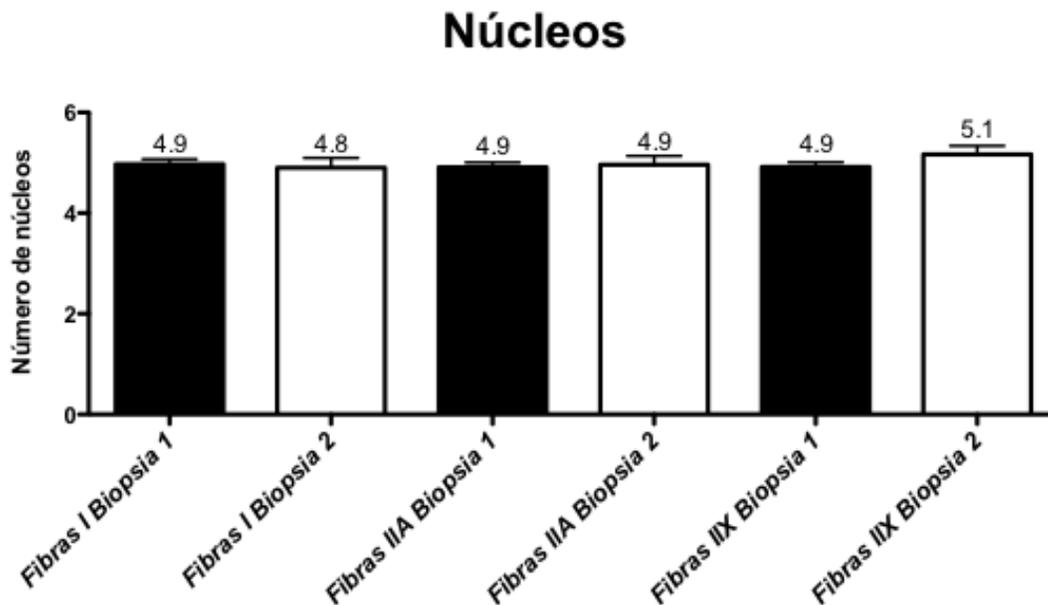
Gráfica 2. Área de la población celular antes y después del entrenamiento, donde hay cambios significativos solo para las células IIA*.

Núcleos

La media de la cantidad de núcleos por célula en las fibras tipo I, fue de 4.9, con un error estándar de 0.12, para el muestreo de la primera biopsia, y para la segunda biopsia, la media que presentó fue 4.8, con un error estándar de 0.15. No hubo cambios significativos P 0.30

La media de la cantidad de núcleos para las fibras tipo IIA es de 4.9, con un error estándar de 0.15 para la primera biopsia, y para la segunda biopsia la media que presentó fue 4.9, con un error estándar de 0.14. No hubo cambios significativos P 0.4458.

La media de la cantidad de núcleos por célula tipo IIX es de 4.9, con un error estándar de 0.16 para la primera biopsia y para la segunda biopsia, la media que presentó fue de 5.1, con un error estándar de 0.14. No hubo diferencia significativa P 0.4604 (Gráfica 3).



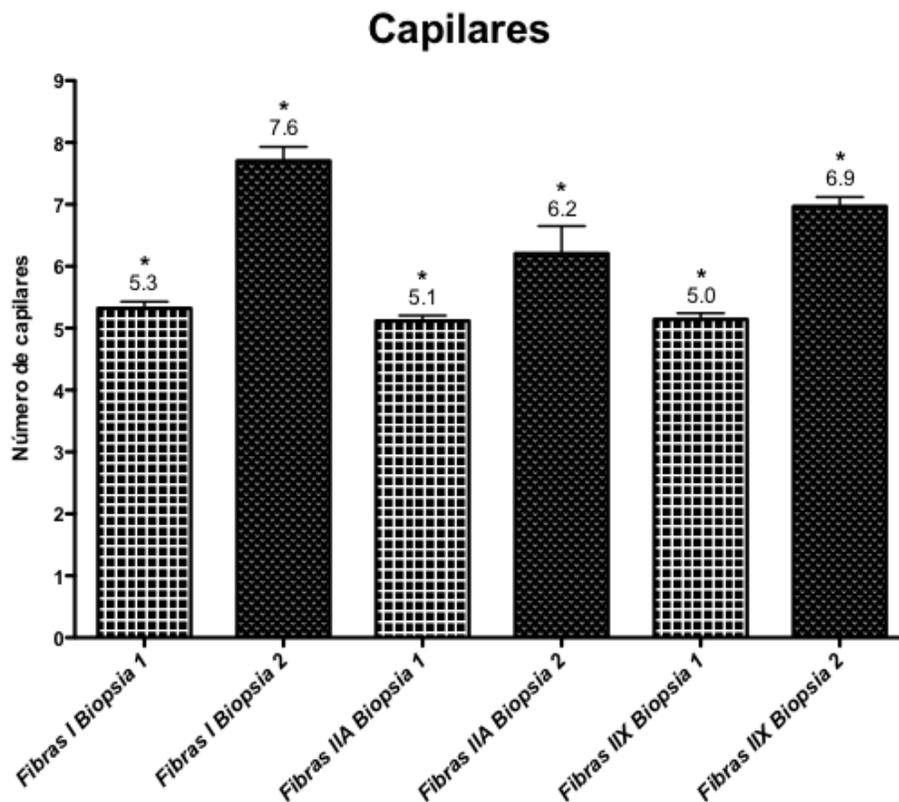
Gráfica 3. Efecto del entrenamiento sobre el número de núcleos en las fibras musculares, antes y después del entrenamiento, sin cambios significativos.

Capilares

La media de capilares para las células tipo I es de 5.3, con un error estándar de 0.12 para la primera biopsia y para la segunda biopsia, la media que presentó fue 7.6, con un error estándar de 0.15. Se encontraron cambios significativos $P < 0.0001$ entre las dos biopsias, para este tipo de células.

Para las células tipo IIA la media de capilares fue 5.1, con un error estándar de 0.11 para la primera biopsia y para la segunda biopsia, la media que presentó fue 6.2, con un error estándar de 0.10. Se encontraron cambios significativos $P < 0.0001$ entre las dos biopsias, para este tipo de células.

La media de capilares para las células tipo IIX es de 5.0, con un error estándar de 0.13 para la primera biopsia y para la segunda biopsia, presentó una media de 6.9, con un error estándar de 0.11. Se encontraron cambios significativos $P < 0.0001$ entre las dos biopsias, para este tipo de células (Gráfica 4).



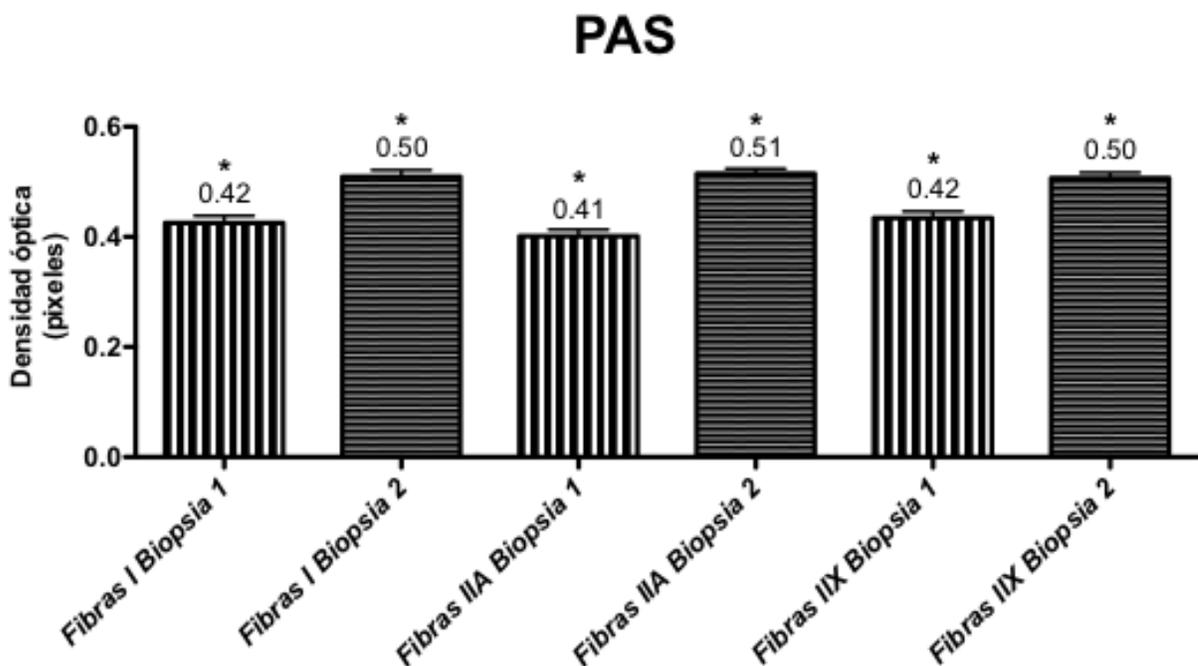
Gráfica 4. Efecto del entrenamiento sobre el número de capilares en las células musculares, antes y después del entrenamiento, observándose un incremento significativo en el número de capilares * con una $P < 0.05$.

PAS

La densidad óptica en la tinción de ácido periódico de Shift, en las fibras musculares tipo I, es de 0.42 para la primera biopsia con un error estándar de 0.01 y 0.50 para la segunda biopsia con un error estándar de 0.01. Se encontraron cambios significativos $P < 0.0001$ entre las dos biopsias para este tipo de células.

Para las fibras musculares tipo IIA es de 0.41 para la primera biopsia con un error estándar de 0.01 y de 0.51 para la segunda con un error estándar de 0.01. Se encontraron cambios significativos $P < 0.0001$ entre las dos biopsias para este tipo de células.

Para las fibras musculares tipo IIX es de 0.42 para la primera biopsia con un error estándar de 0.01 y de 0.50 para la segunda con un error estándar de 0.01. Se encontraron cambios significativos $P < 0.0001$ entre las dos biopsias para este tipo de células (Gráfica 6).



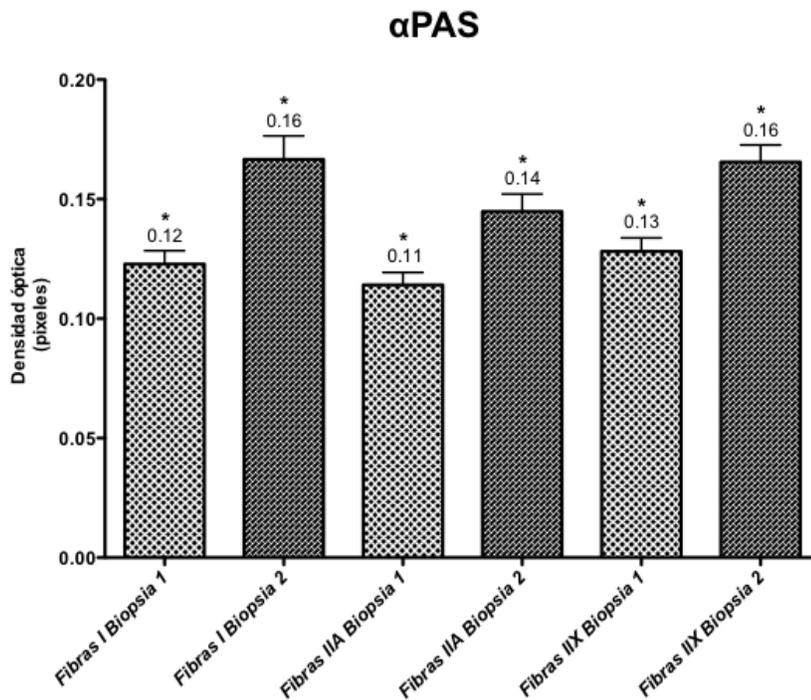
Gráfica 6. Efecto del entrenamiento sobre la cantidad de glucógeno almacenado en las células musculares, antes y después del entrenamiento, mostrando un incremento significativo* en los tres tipos celulares con una $P > 0.05$.

Alfa PAS

La densidad óptica para las fibras musculares tipo I es de 0.12 para la biopsia A con un error estándar de 0.006 y 0.16 para la biopsia B con un error estándar de 0.007. Se encontraron diferencias significativas $P < 0.0001$ entre las dos biopsias para este tipo celular.

Para las fibras musculares tipo IIA la densidad óptica es de 0.11 para la biopsia A con un error estándar de 0.005 y 0.14 para la biopsia B con un error estándar de 0.005. Se encontraron diferencias significativas $P < 0.0001$ entre las dos biopsias para este tipo celular.

La densidad óptica para las fibras musculares tipo IIX, es de 0.13 para la biopsia A con un error estándar de 0.006 y 0.16 para la biopsia B con un error estándar de 0.005. Se encontraron diferencias significativas $P < 0.0001$ entre las dos biopsias para este tipo celular (Gráfica 7).



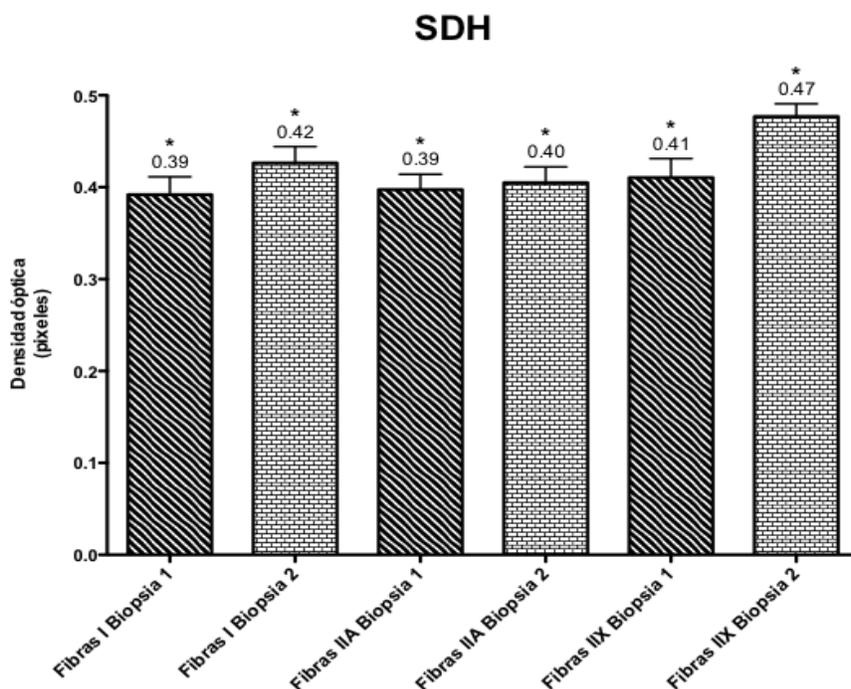
Gráfica 7. Efecto del entrenamiento sobre la cantidad de carbohidratos complejos en las células musculares, antes y después del entrenamiento, hay un incremento de sustratos polisacáridos para los tres tipos celulares* con una $P > 0.05$.

SDH

La actividad de la enzima succinil deshidrogenasa fue determinada por densidad óptica, donde para las fibras musculares tipo I, dieron una media de 0.39 para la biopsia A con un error estándar de 0.01 y 0.42 en la biopsia B con un error estándar de 0.01. Se encontraron cambios significativos $P = 0.01726$ entre las dos biopsias.

Para las fibras musculares tipo IIA sus medias fueron 0.39 para la biopsia A con un error estándar de 0.01 y 0.40 para la biopsia B con un error estándar de 0.01. Se encontraron cambios significativos $P = 0.0166$ entre las dos biopsias.

Para las fibras musculares tipo IIX sus medias fueron, de 0.41 para la biopsia B con un error estándar de 0.019 y 0.47 para la biopsia B con un error estándar de 0.01. Se encontraron cambios significativos $P = 0.0001$ entre las dos biopsias (Gráfica 8).



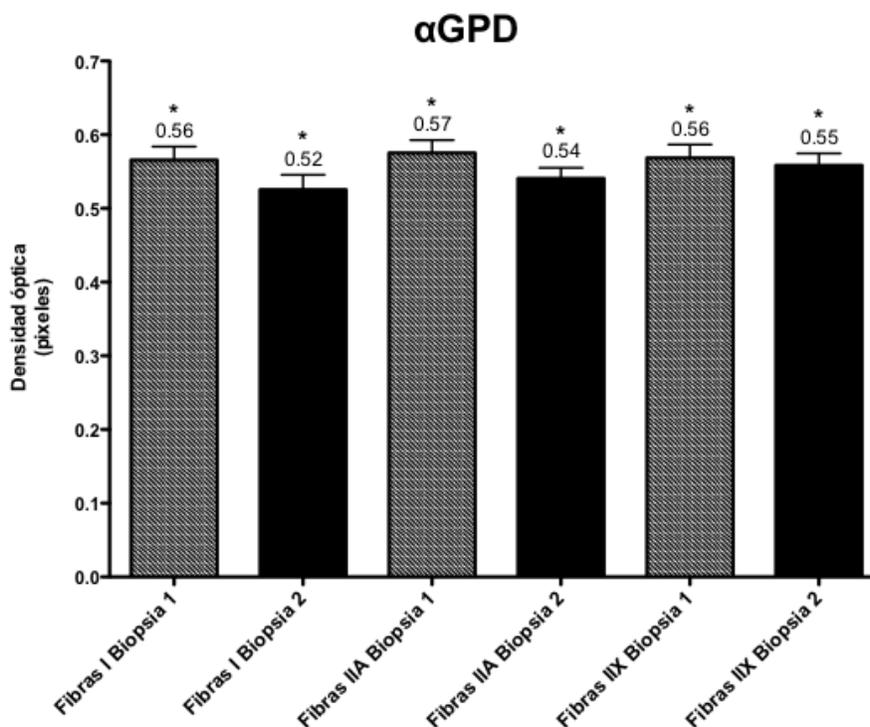
Gráfica 8. Efecto del entrenamiento sobre la cantidad de enzima succinil deshidrogenasa presente en las células musculares antes y después del entrenamiento, mostrando un incremento significativo* con una $P < 0.05$.

ALFA GPDH

La densidad óptica de las fibras musculares tipo I es de 0.56 para la biopsia A con un error estándar de 0.01 y de 0.52 para la biopsia B con un error estándar de 0.02. Se encontraron diferencias significativas $P < 0.0001$ entre las dos biopsias en este tipo celular.

En las fibras musculares tipo IIA su densidad óptica es de 0.57 para la biopsia A con un error estándar de 0.01 y de 0.54 para la biopsia B con un error estándar de 0.01. Se encontraron diferencias significativas $P < 0.0001$ entre las dos biopsias en este tipo celular.

Para las fibras musculares tipo IIX su densidad óptica es de 0.56 para la biopsia A con un error estándar de 0.01 y de 0.55 para la biopsia B con un error estándar de 0.01. Se encontraron diferencias significativas $P < 0.0001$ entre las dos biopsias en este tipo celular (Gráfica 9).



Gráfica 9. Efecto del entrenamiento sobre la cantidad de enzima GPDH presente en las células musculares, antes y después del entrenamiento, con una disminución significativa* de esta, con una $P < 0.05$.

ATPasa miofibrilar ácida

Para la ATPasa ácida las fibras musculares tipo I, la densidad óptica es de 0.76 para la biopsia A con un error estándar de 0.01 y de 0.73 para la biopsia B con un error estándar de 0.01. No se encontraron diferencias significativas $P = 0.2762$ entre las dos biopsias en este tipo celular.

Para las fibras musculares tipo IIA es de 0.68 para la biopsia A con un error estándar de 0.01 y de 0.53 para la biopsia B con un error estándar de 0.01. Se encontraron diferencias significativas $P = 0.0001$ entre las dos biopsias para este tipo celular.

En las fibras musculares tipo IIX, la densidad es de 0.62 para la biopsia A con un error estándar de 0.01 y de 0.39 para la biopsia B con un error estándar de 0.01. Se encontraron diferencias significativas $P = 0.0001$ entre las dos biopsias para este tipo celular (Gráfica 10).

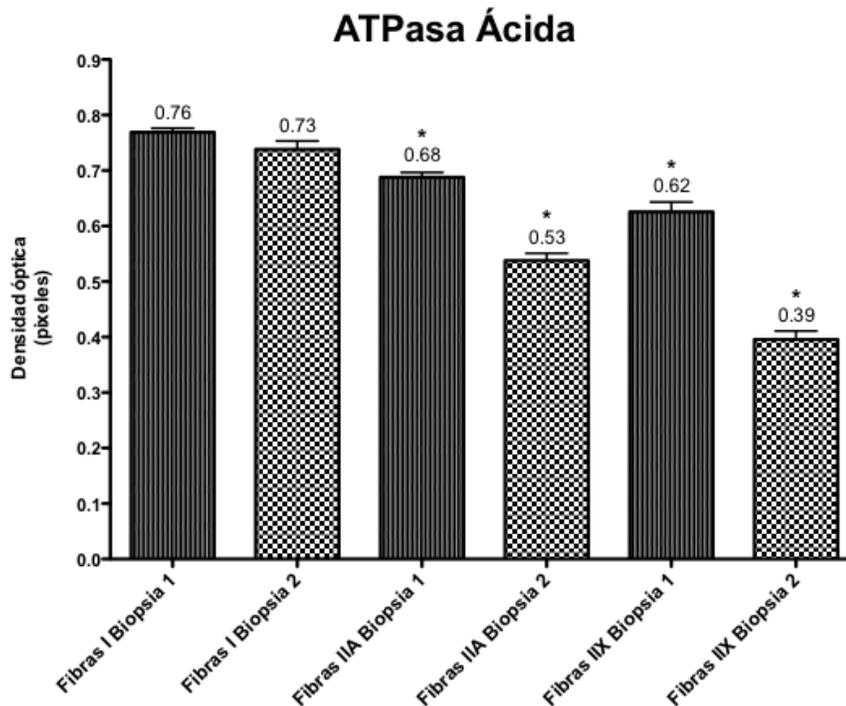


Gráfico 10. Efecto del entrenamiento sobre la enzima ATPasa miofibrilar presente en las células musculares, antes y después del entrenamiento, mostrando un cambio significativo para los tipos celulares IIA e IIX con una $P > 0.05$.

7. DISCUSIÓN

El rendimiento de un atleta equino está determinado por varios procesos biológicos interdependientes, por lo que es importante conocer cómo funcionan estos procesos y como interaccionan unos con otros, si se quiere entrenar y tratar en a un caballo con eficacia en su vida competitiva (Hinchcliff, 2007). El estudio de los cambios fisiológicos, morfológicos y celulares del músculo esquelético en el equino han permitido clasificar sus propiedades contráctiles, metabólicas y morfológicas frente a estímulos fisiológicos (ejercicio, entrenamiento, desentrenamiento), patológicos (miopatías primarias y secundarias) y farmacológicos (Quiroz, 2001). La adaptación morfo-metabólica y contráctil del músculo esquelético se da en relación a la naturaleza (frecuencia, intensidad y duración) y tipo de estímulo (ejercicio o entrenamiento), su respuesta adaptativa puede llevarnos a diferentes formas de adaptación: hipertrófica, de remodelación (metabólica y estructural) y respuesta mixta. La modalidad y amplitud de la respuesta depende de forma significativa del perfil muscular previo al entrenamiento (Boffi, 2008). Esta situación ha sido ampliamente revisada por diferentes investigadores en el área (Leisson, 2008; Rivero, 2007; Puhke et al., 2006). Es bien sabido que las adaptaciones más importantes del músculo esquelético en un entrenamiento programado, se producen durante un tiempo medianamente largo (semanas o meses) y estas adaptaciones son diferentes a aquellas que se dan de forma esporádica y aislada (Quiroz, 2001; Rivero et al., 1995), bajo diferentes condiciones.

El objetivo del presente trabajo fue conocer si el entrenamiento de moderada intensidad nos puede llevar a una adaptación morfo-metabólica y contráctil de las fibras musculares en los caballos deportivos (de alto rendimiento), mediante técnicas que nos permiten, interpretar dichos cambios; así como la tipificación de fibras musculares mediante el análisis por imagen.

Los resultados mostraron una respuesta celular de adaptación a la carga de trabajo, se manifestó en incremento de la población celular en los tipo IIA y IIX pero no de forma significativa tras el periodo de entrenamiento, mientras que las

células tipo I se halló un descenso significativo, lo que nos sugiere una respuesta de compensación celular, remarcando al tipo IIA, que son de un metabolismo intermedio. Este cambio cuantitativo (aumento en el número) en cuanto a la población de fibras nos pudiera sugerir que la demanda del trabajo, era elevada y la población celular no solo respondía con un incremento de células tipo IIX, sino que también dirigiéndolas hacia un tipo oxidativo, de ahí que se muestre ese repunte en las células IIA, que son un estado intermedio entre fibras rápidas y lentas. El estímulo provocado por el entrenamiento, por determinado tiempo provoca adaptaciones metabólicas acompañado por una transformación en los tipos de fibra (Serrano *et al.*, 2000). Estudios ha mostrado que la composición fibrilar y su área varia significativamente entre razas y de acuerdo al tipo de trabajo que realizan (Rivero y Diz, 1992).

Las áreas transversales de las células, no presentaron cambios significativos en cuanto a los tipos celulares I y IIX, mientras que en el tipo celular IIA si presentó cambios en cuanto a su área, con respecto a su estado basal antes del entrenamiento. Rivero (2006) menciona que la respuesta al entrenamiento puede tomar dos vías, la primera es de tipo cuantitativo (hipertrofia) donde las fibras aumentan de tamaño, pero mantienen su estado basa en cuanto a su estructura, fisiología y propiedades bioquímicas. La segunda vía es una respuesta de tipo cualitativo, donde las miofibras no cambian de tamaño, pero adquieren características estructurales y enzimáticas diferentes a las basales. La respuesta muscular a un programa de entrenamiento de moderada intensidad, va dirigida hacia la remodelación de la fibra con una discreta hipertrofia de la fibra muscular (Serrano *et al.*, 2000). Basados en lo anterior podemos decir que se presenta una respuesta de tipo mixta en las células, donde tenemos características que encajan en el patrón de cuantitativas (hipotrofia localizada a las células IIX) y otras cualitativas, que encajarían en lo escrito por Vock *et al* (1996) reporta que junto con el tejido conectivo interfibrilar, también se encuentran reservas energéticas en forma de grasa, incrementando así el área transversal de la célula en estudio; al adaptarse la célula a las nuevas demandas su metabolismo vira hacia un tipo oxidativo, donde esta grasa seria consumida de primera intención bajo las nuevas

demandas energéticas del ejercicio disminuyendo el área transversal de la célula de forma moderada, esto coincide con las observaciones de Helge (2008), la grasa es el principal combustible para el trabajo muscular aumentando la capacidad lipolítica en el músculo.

En el número de núcleos se no se encontró ningún cambio significativo, para los tres tipos celulares después del entrenamiento. La cantidad de núcleos y su tamaño determinan el potencial de la fibra muscular (Booth y Baldwin, 1998), y está relacionado posiblemente con la síntesis de proteína (Quiroz, 2001), en donde la remodelación muscular compromete a la proteína basal, por proteína nueva, de acuerdo con las necesidades actuales del músculo (Seene, 2005); quizás la razón por la que no se encontraron cambios en la cantidad de núcleos, se pudo deber, a que no hay como tal una hipertrofia, donde el incremento en el número de núcleos, pudiera ser relacionado a un daño ultraestructural causado por el ejercicio (Takekura y Yoshiota, 1990), así también se podría relacionar con una estabilización de estos, cuando se alcanza un punto en el entrenamiento, debiendo haber tomado una biopsia a la mitad del tiempo de entrenamiento (seis semanas), donde quizás se pudieran ver cambios, ya que se encontraría en completo proceso de adaptación al régimen de ejercicio.

La capilaridad observó un incremento significativo en el número de capilares para cada tipo celular, evidenciándose un efecto escalera donde las fibras tipo I, es la que mas capilares presenta. En el ejercicio el aporte inicial de oxígeno y de nutrientes se vuelven insuficientes para cubrir los requerimientos del musculo que está sufriendo transformaciones (Tesch *et al.*, 1984). Este incremento de capilares se asocia a una mayor demanda de oxígeno y de nutrientes por parte de las células, se incrementa la presión intravascular, provocando estrés en las paredes del capilar, provocando una ramificación que disminuirá, la distancia a cubrir por un solo capilar. Estos cambios encontrados en la cantidad de capilares después del entrenamiento, concuerdan con lo publicado por López Rivero (1995), en un mismo periodo de tiempo.

En cuanto a la cantidad de glucógeno, se encontró que el contenido fibrilar se incremento de forma significativa después de doce semanas de entrenamiento, esto puede estar asociado a una respuesta compensatoria del organismo en cuanto a la disposición de glucosa circulante y su captación por las células musculares, lo cual está regulado por la tirosina cinasa, dependiente de la insulina, que al ser estimulada promueve la adhesión de mas transportadores de glucosa en la membrana celular; además de la unión de la insulina con su receptor (T.C.) activa también a la enzima glucógeno sintetasa que cataliza la producción de glucógeno en las células musculares (Fox, 2008). Cuando se incrementa la intensidad del ejercicio de forma moderada, no hay el aporte suficiente de oxígeno a la fibra muscular, pero si el necesario para que parte de la energía provenga del metabolismo aeróbico. El entrenamiento ha demostrado un incremento en los depósitos de glucógeno almacenado en los músculos, que podría estar asociado a una disminución de enzimas glucolíticas (Boffi, 2008).

En la actividad de la enzima succinil deshidrogenasa se encontró un repunte en esta enzima, en una mayor proporción para las fibras IIX, mientras que las fibras IIA y I, el incremento no es tan marcado, esto puede deberse a proceso de plasticidad donde los músculos de contracción rápida sufren una conversión hacia un perfil mas oxidativo con el estímulo del entrenamiento, cualquier actividad contráctil como el ejercicio, produce una transformación hacia un músculo más lento y con sus respectivos cambios metabólicos (Henckel, 1997). Los resultados concuerdan con lo reportado por Eto et al (2003) quien encontró en sus análisis un aumento en la actividad de la enzima SDH en la fibras IIX, con respecto a los otros dos tipos de fibras. En cuanto a los resultados con respecto a la actividad de la enzima alfa glicerofosfato deshidrogenasa, se presentó un descenso significativo de esta, para los tres tipos celulares, lo que nos muestra un cambio en cuanto al metabolismo, dado que el entrenamiento es aeróbico. Al inicio del entrenamiento hay una disminución en el aporte de oxígeno lo que lleva a incrementar la actividad glucolítica (López Rivero, 2007), pero una vez que el músculo se adapta al entrenamiento dicha actividad se normaliza y se vuelve un metabolismo de tipo

oxidativo y la eficiencia en el consumo de glucógeno por vías aeróbicas se estabiliza.

La actividad de la enzima ATPasa miofibrilar a un pH de 4.6, mostro que hay cambios significativos, bajando su actividad en los tipos celulares IIA y IIX, mientras que en el tipo I, no hubo cambios significativos, quizás debido a que se realizaba un ejercicio aeróbico y dichas células son completamente oxidativas. En este sentido cabe recordar que la actividad de la enzima ATPasa miofibrilar tiene un comportamiento paralelo a la capacidad oxidativa de las células musculares (Torres, 2011). La actividad de enzimática que presenta la fibra muscular, permite conocer indirectamente la capacidad de contracción de la fibra (Young, 1984). La baja de la actividad de dicha enzima en los dos tipos celulares se puede correlacionar a que se incremento la población de estas, en una forma de compensación, lo que concuerda con lo escrito por Leisson et al (2008), el entrenamiento en caballos incrementa la capacidad oxidativa de las fibras musculares del glúteo medio y causa una transición en las isoformas de las cadenas pesadas de la miosina de forma IIX►IIA►I. Estas modificaciones van siempre unidas a cambios metabólicos, ultraestructurales y microvasculares (López Rivero y Quiroz, 2001), esto concuerda con el perfil de entrenamiento aplicado.

La relevancia de este estudio se basa en que se pueden evaluar las transformaciones que sufre el musculo esquelético en modelos animales, mediante técnicas básicas de laboratorio, mientras es sometido a un periodo de entrenamiento; donde el tiempo de entrenamiento y el numero de biopsias se pueden elevar para tener más datos de diferentes tiempos de adaptación del musculo esquelético, pudiéndose enfocar al desarrollo de perfiles atléticos de caballos de alto rendimiento deportivo, con base a su capacidad de adaptación muscular. Sin embargo la tipificación de fibras musculares por la técnica histoquímica ATPasa miofibrilla, tiene sus limitaciones, por el hecho de que un número considerable tiene una composición de miosina mixta (fibras hibridas, que expresan dos isoformas de cadenas pesadas de miosina) y esta técnica no puede

determinarlas de forma precisa (Andersen *et al*, 1994). Por lo cual en estudios posteriores se pueden complementar con técnicas de inmunohistoquímica, con anticuerpos monoclonales, que daría una identificación más precisa de las diferentes isoformas de las cadenas pesadas de la miosina presentes en el musculo esquelético (Linanne *et al.*, 1999) ya que la técnica de inmunohistoquímica es altamente sensible (Pette y Staron, 1997).

8. CONCLUSIONES

La evaluación del músculo esquelético bajo entrenamiento de moderada intensidad en caballos sanos, mostró cambios estructurales y metabólicos a nivel celular, que ayudaron a compensar la carga de trabajo, que implica el entrenamiento.

Cuando se somete a entrenamiento un organismo, la actividad de la enzima ATPasa miofibrilar se altera de acorde al tipo de estímulo que se induzca; en entrenamiento de tipo aeróbico, esta tiende a bajar su actividad en músculos rápidos, debido a la alteración de su metabolismo, ya que sufren una transición hacia un metabolismo más oxidativo, por ende la velocidad de contracción se vuelve más lenta pero sostenida.

La intensidad del entrenamiento va a influenciar de forma rígida, el comportamiento celular con respecto a su área transversal, y de igual forma en la cantidad de capilares, y solo si hay hipertrofia marcada o daño estructural de las fibras musculares, los núcleos se incrementarán.

Se demostró que un régimen de entrenamiento nos lleva a una plasticidad muscular, el entrenamiento de moderada intensidad confirmó la conversión de un músculo glucolítico hacia un músculo más oxidativo, contribuyendo con ello posiblemente a que se presente una resistencia a la fatiga muscular.

9. ANEXOS

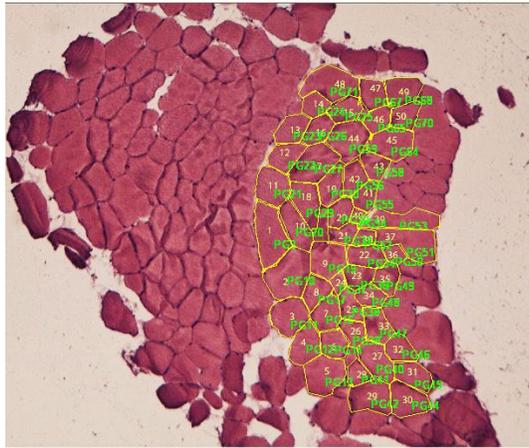


Imagen 1. Medición de áreas transversas en la tinción HyE.

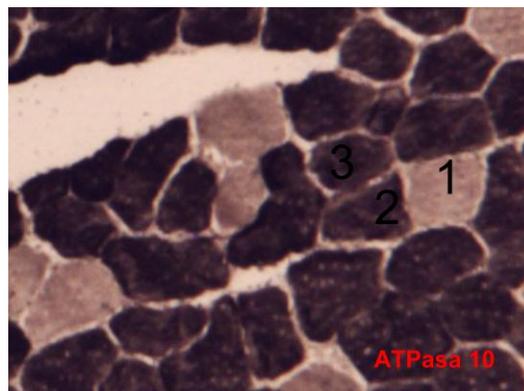


Imagen 2. Tinción ATPasa a un pH de 10.

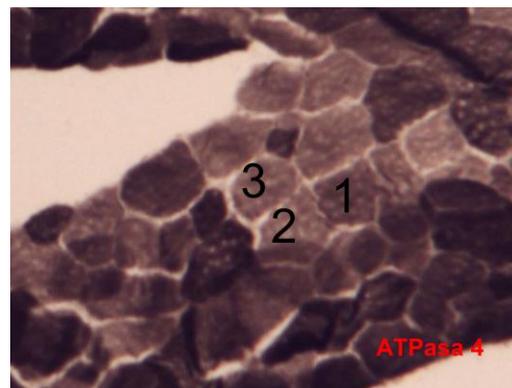


Imagen 3. Tinción ATPasa a un pH de 4.5.

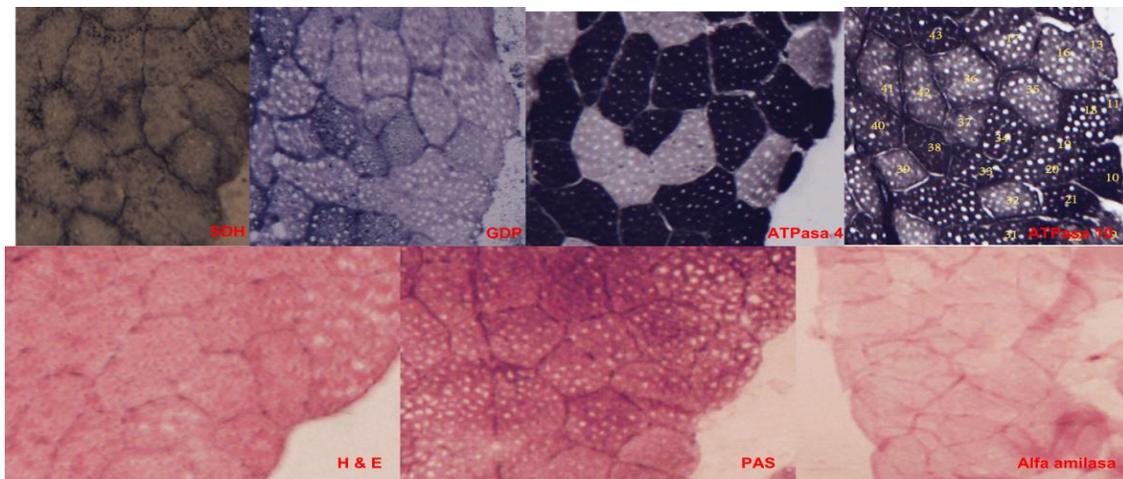


Imagen 4. Batería de tinciones correspondiente a la primera biopsia

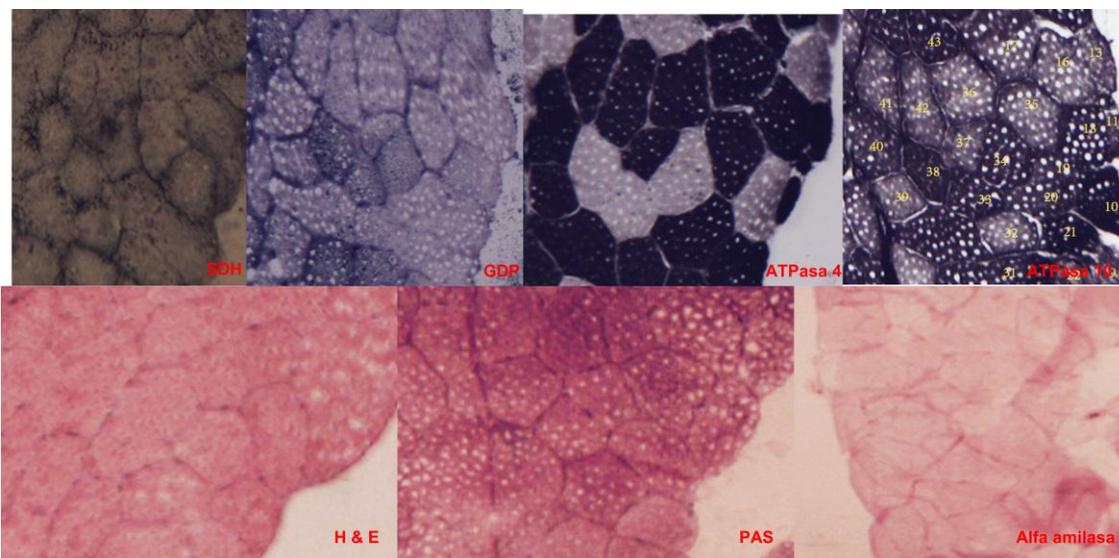


Imagen 5. Batería de Tinciones correspondiente a la segunda biopsia

Biopsia A		I	IIA	IIX
Área	Std Error	117.22241	104.2398	129.6179
	Media	2689.26	2849.68	2882.54000
Núcleos	Std Error	0.12785382	0.15314988	0.16534333
	Media	4.952	4.90551	4.92857
Capilares	Std Error	0.12544059	0.11292402	0.13136408
	Media	5.328	5.13386	5.06122
PAS	Std Error	0.01100759	0.01082916	0.01278403
	Media	0.422554	0.410696	0.428848
Alfa PAS	Std Error	0.00608687	0.00584614	0.00631946
	Media	0.123898	0.118491	0.134883
SDH	Std Error	0.0171337	0.01807451	0.02063853
	Media	0.398454	0.394332	0.414634
GPDH	Std Error	0.01696257	0.01684339	0.01925972
	Media	0.568811	0.578512	0.563882
ATPasa 4.6	Std Error	0.01835946	0.01245629	0.01044591
	Media	0.76446	0.689099	0.629939

Cuadro 3. Registro de los datos del análisis estadístico, por tinción y fibra muscular, considerando su error estándar = Std Error y su media de la biopsia A

Biopsia B		I	IIA	IIX
Área	Std Error	140.50961	99.99905	114.46858
	Media	2546.92	2706.19	2650.45
Núcleos	Std Error	0.15325304	0.14691934	0.14640122
	Media	4.88506	4.96377	5.16
Capilares	Std Error	0.1503604	0.10832998	0.11678278
	Media	7.68966	6.21884	6.98387
PAS	Std Error	0.01319434	0.0103886	0.01131946
	Media	0.505759	0.51498	0.504199
Alfa PAS	Std Error	0.00729608	0.0056083	0.00577003
	Media	0.164755	0.144796	0.165795
SDH	Std Error	0.01883496	0.01715816	0.01805328
	Media	0.427462	0.404948	0.475041
GPDH	Std Error	0.01033233	0.01733919	0.01827413
	Media	0.526907	0.540777	0.556829
ATPasa 4.6	Std Error	0.01252108	0.01194954	0.01625616
	Media	0.731068	0.537547	0.397543

Cuadro 4. Registro de los datos del análisis estadístico, por tinción y fibra muscular, considerando su error estándar = Std Error y su media de la biopsia B

TIPO CELULAR	PRIMERA BIOPSIA			SEGUNDA BIOPSIA		
	IIX	IIA	I	IIX	IIA	I
% CELULAR	34.0	37.1	28.5	35.7	37.4	▼ 24.8
ÁREA	2882.5	2849.6	2689.2	2650.4	2706.1	2546.9
NÚCLEOS	4.9	4.9	4.9	5.1	4.9	4.8
CAPILARES	5.0	5.1	5.3	▲ 6.9	▲ 6.2	▲ 7.6
PAS (D.O)	0.42	0.41	0.42	0.50 ▲	0.51 ▲	0.50 ▲
ALFA PAS (D.O.)	0.13	0.11	0.12	0.16 ▲	0.14 ▲	0.16 ▲
ALFA GPDH (D.O.)	0.56	0.57	0.56	0.55 ▲	0.54 ▲	0.52 ▲
SDH (D.O.)	0.41	0.39	0.39	0.47 ▲	0.40 ▲	0.42 ▲
ATPasa Alcalina (D.O.)	0.62	0.68	0.76	0.39 ▼	0.53 ▼	0.73

Cuadro 5.- Cambios significativos entre la primera y la segunda biopsia

En este cuadro se muestra los cambios significativos entre la primera biopsia y la segunda biopsia en las fibras tipo IIX, IIA y I, para cada una de las tinciones realizadas. (▲) incremento significativo, (▼) disminución significativa, (=) no hay cambios. (D.O.= Densidad Óptica).

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Adhietty JP, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood AD. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Experimental Physiology* (2003) 88.1, 99-107.
2. Aigner B, Pette D. Fast to slow transition in myosin heavy chain expression of rabbit muscle fibers induced by chronic low frequency stimulation. *Eur J Biochem.* (1997) 1; 247(1): 98-106.
3. Alberts B., Jhonson, Alexander, Lewis, Raff, Roberts, Walter Julian. *Biología molecular de la célula*. Quinta edición. Ediciones Omega. 2010
4. Andersen P. and Henriksson J. Capillary Supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptive response to exercise. *Great Britain. J. Physiol.* (1977), 270, pp 677-690.
5. Andersen J. L, Klitgaard H, Saltin B. Myosin Heavy chain isoforms in single fibers from *m. vastus lateralis* of sprinters: influence of training. *Acta Physiol. Scan* (1994) 151:135-142.
6. Andrews, M. F, Spurgeon, L. T. Histochemical staining characteristics of normal horse skeletal muscle. *Am. J. Vet Res.* (1986) Vol 47 num. 8.
7. Baldwin K.M, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am. J Phys Med. Rehabil* 2002; 81(suppl): s40-s51.
8. Barret E. K, Boitanos., Barma M. S, Brooks L. H. *Ganong fisiología medica*. 23 ediciones. McGraw-Hill. México. 2000. pp. 2010.
9. Bernardi, P., Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspect and methodological. *Issues. Eur. J. Biochem.* 264, 687-701 (1999).
10. Billat V. *Fisiología y metodología del entrenamiento, de la teoría a la práctica*. ed. Paidotribo. 2002 pp. 52-63.
11. Boffi F. *Fisiología del ejercicio en equinos*. Primera edición. Editorial Intermedica. Buenos Aires, Argentina. 2007.
12. Boffi, M.F., *Entrenamiento y adaptación muscular. Sustratos y vías metabólicas para la producción de energía*. *R. Bras. Zootec. V.* 37. Suplemento especial. 2008. P 197-201.

13. Booth F.M, Baldwin K. M. Muscle plasticity: energy demand and supply processes. In: Rowell L. B, Shepherd J. T. Handbook of physiology. American Physiological soc. Bethesda. Md. 1996, 1075-1123.
14. Booth F, Tseng B, Flück M & Carson J. molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. Acta. Physiol. Scand.162, 1998. P. 343-350.
15. Bortolotto SK, Cellini M, Stephenson DG, Stephenson GM. MHC isofirm composition and Ca (2+) or Sr (2+) activation properties of rat skeletal muscle fibers. Am J Physiol. 2000 Nov; 279(5):c1564-77.
16. Bottinelli R, Reggiani, C. Human skeletal muscle fibers: molecular and functional diversity. Progress Biophysics & Molecular Biology, 2000; 73; 73: 195-262.
17. Bryson- Richarson R. J. Currie P. D. The genetics of vertebrate myogenesis, Nature Medicine. August 2008. Vol. 9.
18. Brooke, M.H. and Kaiser, K.K. Muscle fiber types: How many and what Kind? Arch. Neurol. (1970) 23: 369-379.
19. Cameron-Smith D. Exercise and skeletal muscle gene expression. School Health Sci. Burwood., Australia. 2009.
20. Colville T, Basert M. J. Clinical anatomy and physiology for veterinary technicians. Mosby. EUA. 2002. pp. 254.
21. Cunningham G. J, Klein G. B. Fisiología Veterinaria. Cuarta edición. Saunders-Elsevier. Barcelona, Es. 2009. pp. 86-89.
22. Dubowitz V, Pearse A.G. Oxidative enzymes and phosphorylase in central-core disease of muscle. Lancet. 1960 Jul 2:2/7140): 23-4.
23. Escamilla R. Wickham R. acondicionamiento y rehabilitación mediante el ejercicio. En: Kult G. S, Snyder-Mackler, Renstrom P. Fisioterapia del deporte y el ejercicio. Elsevier España. 2009. P. 145-165.
24. Essen Gustavsson, B Activity and inactivity related muscle adaptations in the animal kingdom. In Biochemistry of exercise, international series on sport sciences. (1985) Vol 13.
25. Eto, D., Yamano, S., Kasashima, Y., Sugiura, T., Nasu, T., Tokuriki, M., Miyata, M., Effect of controlled exercise on middle gluteal fiber composition in thoughtbred foals. Equine Vet. J. (2003). 35(7) 676-680.

26. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of the VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003. volume 9 number 6
27. Flück M. Review functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *The journal of experimental Biology* 209. 2006. P. 2239-2248.
28. Fox, A. S. *Fisiología humana*. Decima Edición. Ed. Mcgraw-Hill. pp. 106-126(2008).
29. Gilbert F.S. *Developmental biology*. Fifth edition. Sinauer Assoc. Publisher. Sunderland. Massachusetts. 1997.
30. Goldspink G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. *Comparative biochemistry and Physiology B*. 120. 1998. P. 5-15.
31. Gollnick, P D, Armstrong R B, Saubert C W. Enzyme activity and fiber compositions in skeletal muscle of untrained and trained men. *Journal of applied Physiology* 33, 1971. P 312-319.
32. Gordon, M.A., Homsher, E., Regnier I. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Scand. Review*. (2000) Vol 8:853-924.
33. Guyton C. A, Hall E. J. *Tratado de fisiología medica*. Decimo primera edición. Elsevier. España. 2007. pp. 79.
34. Hansen K. A, Fischer P, Plomgaard P, Levin A. J, Saltin B, Klarlund P. B. Skeletal Muscle adaptation: training twice every second day vs. training once daily. *J. Am. Physiol*. 2005 98:93-99.
35. Helge JM, Damsgaard R., Overgaard K., Andersen J.L., Donsmark M., Dyscorkog S.E, Hermanson K, Saltin B, Dougard J. R. Low intensity training dissociates metabolic from aerobic fitness. *Scan J. Med Sci. Sport* 2008; 18:86-94.
36. Hill E. R, Wyse A. G, Anderson M, *Animal Physiology*. Second edition. Sinauer Assn. EUA. 2008.
37. Henckel, P. Training and grown induced changes in the middle gluteus muscles of young standardbred trotters. *Equine vet J*. 1983 15: 134-140.
38. Holloszy, J.O., Biochemical adaptation in muscle effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem*. (1967). 242:2278-2282.

39. Hoppeler H, Flück M. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Journal of the American College of Sport Medicine*. 2002. P. 95-104.
40. Hoppeler, H., Howald, H., Conley, K. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (1985). 59: 320-327.
41. Kayar SR, Hoppeler H, Howald H, Classen H, Oberhlozen F. Acute effects of endurance exercise on mitochondrial distribution and skeletal muscle morphology. *Eur. J. Appl. Physiol.* 54:578-584, 2001.
42. Kent C. G, Carr K. R. *Comparative Anatomy of the vertebrates*. Ninth Edition. McGraw-Hill. USA. 2001. Cap. 11: Muscle pp. 234-264.
43. Koffi I, Safar ME, Labat C, Locally P, Benet's A, Mourad JJ. Arterial structural changes with verapamil in spontaneously hypertensive rats. *Am. J Hypertens.* 1999. 12(7):732-8.
44. Legido A. J. C, Calderón M. F. J. *Fisiología del ejercicio en: Arisnavarreta C, Cachofeiro V., Cardinali D., Escrich E., Lozayga G. P, Lahera V. J., Mora T. F, Romano P. M., Tamargo M. J. Tresguerres J. A. F, Fisiología humana. Tercera edición. McGraw-Hill. Madrid. Es. 2005. pp. 21-22.*
45. Leisson K., Jaakma U., Seene T, *Adaptation of Equine Locomotor Muscle Fiber Types to Endurance and Intensive High speed Training. Journal of Equine Vet. Science. Vol 28, No 7 (2008).*
46. Li J.B., Jefferson L.S. Effect of isoproterenol on amino acid levels and protein turnover in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 232(2) 1977.
47. Linnane L., Serrano A. L., Rivero J.L.L. Distribution of fast myosin heavy chain-based muscle fibres in the gluteus medius of untrained horses: mismatch between antigenic and ATPase determinants. *J. Anat.* 1999. 194 pp. 363-372.
48. López Rivero J L. *Patrones morfométricos e histoquímicas de la población fibrilar del musculo glúteo medio del caballo en razas de diferentes aptitudes. Tesis de doctorado. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba, España. 1988.*
49. López Rivero J.L, Quiroz R. E. *Diversidad celular y naturaleza dinámica del músculo esquelético. Compilación jornadas de investigación veterinaria. Córdoba España, 2001: 339 -350.*

50. López Rivero JL. A scientific background for skeletal muscle conditioning in equine practice. *J. Vet. Med.* 54, (2007), 321-332
51. Melvin J. S., Reece U. W. *Fisiología de los animales domésticos*. editorial Limusa. 1999.
52. Muñoz M. J, Peraza C. A. L. *Fisiología del músculo en: Arisnavarreta C, Cachofeiro V., Cardinali D., Escrich E., Lozayga G. P, Lahera V. J., Mora T. F, Romano P. M., Tamargo M. J. Tresguerres J. A. F, Fisiología humana. Tercera edición. McGraw-Hill. Madrid. Es. 2005. pp. 21-22.*
53. Nardin R.A, Johns D.R. Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. *Muscle Nerve.* 2001. 24(2):170-91.
54. Nemeth P and Pette D. Succinate dehydrogenase activity in fibres classified by myosin ATPase in three hind limb muscles of rat. *Great Britain. J. Physiol.* (1981), 320, pp73-80.
55. Pérez E J. I. Efecto del zilpaterol y la ractopamina sobre las características contráctiles, metabólicas y morfológicas en las fibras musculares esqueléticas de los bovinos. tesis de maestría en ciencias. México, DF. 2010.
56. Pette D. Metabolic heterogeneity of muscle fibers. *J. Exp. Biol.* 115, 179-189. 1985.
57. Pette D, Staron S. Mammalian muscle fiber transitions. *Int. Rev. Citol.* 170. 1997. P. 143-223.
58. Picard B., Lefaucheur L., Berri C., Duclos J. M. Muscle fiber ontogenesis in farm animal species. *Reprod. Nutr. Dev.* 42(2002)415-431.
59. Prior M B, Yang H T, & Terlung L R. What makes vessel Grow with exercise training?. *J. Appl. Physiol.* 97. 2004. P. 1119-11128.
60. Posterino, S.G. Current advances in mechanically skinned skeletal muscle fibers. *Proceedings of the Australian Physiological and Pharmaceutical Society* (2001) 33(1): 28- 39
61. Premiani, B, Premiani B. *El caballo. biografía del caballo*. editorial BP. buenos aires argentina 1957.
62. Puhke R., Aunola S., Ailanto P., Alev K., Venojarvi M., Rusko H., Seene T. Adaptative changes of myosin isoforms in response to long strength and power training in middle age men. *J. Sports Sci. And Medicine* (2006) 5, 344-358.
63. Quiroz R E, Rivero J L. Co-ordinated expression of contractile and non-contractile features of equine muscle fibers types characterized by

- immunostaining of myosin heavy chains. *Histochem Cell Biol.* 2001. P. 299-312.
64. Randall D, Burggren W, French K. *Animal Physiology. mechanism and adaptations.* Freeman. USA. 2002. pp. 393.
65. Rivero J. L. L., Diz A. M. *Skeletal muscle Histochemistry of andalusian Horses: a comparative study with other breeds.* *Arch. Zootec.*41(extra): 505-512.1992.
66. Rivero L. J. L, Piercy J. R, *Fisiología Muscular: Respuestas al Ejercicio y el Entrenamiento.* En: Hinchcliff W. K, Kaneps J.A, Geor J. R, Bayly W. *Medicina y Cirugía en los Equinos de Deporte, ciencias básicas y clínicas de los equinos de deporte. Volumen I. Intermédica.* 2007 pp. 53-148.
67. Rivero J L, Ruz M C, Serrano A. *Effects of a 3 months endurance training program on skeletal muscle histochemistry in andalusian, Arabian and anglo-arabian horses.* *Equine vet journal* 27. 1995. P. 51-59.
68. Rudnicki M. A., y Jaenish R. *The MyoD family of transcriptions factors and skeletal myogenesis.* *Bioessays.* 1995. 17: 203-209
69. Sadler W. T, Langman J *Embriología medica con orientación clínica.* 10 edición. ed. panamericana. México. 2008
70. Seene, T., Kaasik, P., Alev, K., Pehme, A., Riso, E.M. *Composition and turnover of contractile proteins in volume overstrained skeletal muscle.* *Int. J. Spots Med.* (2005) 25;438-445
71. Seene, T., Kaasik, P., Alev, K., Pehme, A., Parring, A.M. *Endurance training: volume-dependent adaptation changes in myosin.* *Int. J. Sport. Med.* (2005).25; 815-821.
72. Seene, T., Umnova, M., *Relations between changes in the turnover rate of contractile proteins, activations of satellite cells and ultraestructural response of neuromuscular junctions in the fast oxidative- glicolitic muscle fibers in endurance training rats.* *Basic Appl. Myol.* (1998) 2: 34-46.
73. Serrano A L, Quiroz Rothe E, Rivero J L. *Early and long term changes of equine skeletal muscles in response to endurance training and detraining.* *Pflugers Ach. Dec.* 441. 2000. P. 265-274.

74. Serratos g. H., Duran A. Músculo esquelético. Apuntes de la cátedra de fisiología medica. UNAM. Facultad de Medicina. Departamento de Fisiología. Otoño, 2009.
75. Schiaffino, S., Reggiani, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulations and functional significance. *Physiol. Rev.* (1996). Vol. 76 No 2: 371-423.
76. Sida M E, Ridaura S C, Romero J V. Manual del curso de histoquímica enzimática. Instituto Nacional de Pediatría. México. 1995. pp.15.
77. Silbernagl S. Despopoulos A. Atlas de fisiología. Editorial Medica Panamericana. 2001.
78. Sigel P., Pette D. Intracellular localization of glycogenolytic and glycolytic enzymes ζ in white and red rabbit skeletal muscle. a gel film method for coupled enzyme reactions in histochemistry. *J. Hystochem. Cytochem.* 1969, 17 (4): 225-37.
79. Snow, D.H. Skeletal muscle adaptations. A review. In: *Equine exercise physiology.* eds. D. Snow. S.G.B. person and R. Rose. Granta editions. Cambridge. pp160-183 (1983).
80. Snow, D H and Guy P S. Muscle fiber type composition of a number of limb muscles in different types of horse. *Res Vet Sci.* (1980). 28(2): 137-144.
81. Stephenson M. M. G. Hybrid skeletal muscles fibres: a rare or common phenomenon?. *Proceedings of the Australian Pharmacological Society* (2001)32(1)
82. Takekura, H., Yoshioka, T. Different metabolic response to exercise training programmes in single rat muscle fibers. *J. Muscle Res. Motil.* (1990) 11:105-113.
83. Tesch, P.A., Thorson, A., Kaiser, P. Muscle capillary supply and fiber characteristics in weight and power titters. *J. Apply Physiol.* (1984). 56:35-38.
84. Tickle C. Patterning in vertebrate development. Sinauer publishing. U.K. 2003

85. Torres O A. Estudio del fenotipo celular en el músculo esquelético del caballo durante la anestesia general. Tesis de maestría. UNAM, México, 2011
86. Userpater J, Ferder MD, Inserta P, Stella I Y, Ferder LF, Aplicación del análisis de imágenes computarizado en la histología renal. Rev. Nefrol. Diál. y Trampal. 2003,23(4):139-144.
87. Valverg, S. Glycogen depletion patterns in the muscle of standardbred trotters after exercise of varying intensities and durations. equine vet. J. 1986; 18(6) 479-484.
88. Valberg, S., Essen Gustavson, B., Skoglund, W. H. oxidative capacity of skeletal muscle fibers in race horses: histochemical versus biochemical analysis. Equine Vet. J. (1985). 20(4). 291-295.
89. Vega H. A., Zaráin-Herzberg A. Factores transcripcionales que regulan la expresión Genética en el músculo. BEB 2000. 18(3): 108-117.
90. Vock R, Hoppeler H, Claassen H, Wu D, Billeter R, Weebber J M, Taylor R, Weibel E. Design of the oxygen and substrates pathways. Structural basis of intracellular substrate supply to mitochondria in muscle cells. The Journal Experimental biology. 199 (1996) 1689-1697.
91. Weibel ER, Stereological Methods I: practical methods for biological morphometry. London, UK: Academic Press, 1989; 9, 62.
92. Wells WA, Rainer RO, Memoli VA. Equipment, standardization and application of image processing. Am. J. Clin. Pathol. 1993, 99: 48-56.
93. Wagner PD. Angiogénesis del músculo esquelético, un posible papel de la hipoxia. Adv. Exp Med. Biol. 2001; 502:21-38.
94. Young O. A, The biochemical basis of fiber type in bovine muscle. Meat Sci. 11:123-137. 1984.