

RABDOMIÓLISIS POR EJERCICIO EN EL CABALLO PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANO: ANÁLISIS HISTOQUÍMICO, BIOQUÍMICO Y HEMATOLÓGICO

Exertion Rhabdomyolysis in Venezuelan Thoroughbred Racehorse: Histochemical, Biochemical and Haematological Analysis

Luis Eduardo Sucre P.¹, Héctor José Finol², Sonia Hecker de Torres³, Noelina Hernández³ y Luis Segundo Jordán²

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563, Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.

²Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 47114. Caracas 1041, Venezuela. ³Sección de Adaptación Muscular, Instituto de Medicina Experimental, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, Caracas 1050, Apartado 50587. Venezuela.

RESUMEN

Para la realización del presente estudio, se tomaron biopsias musculares por punción percutánea al *M. G. medius*, así como muestras de sangre a cincuenta y un CPSC (3-4 años de edad). Dieciseis de estos animales (Grupo I), se encontraban clínicamente sanos e inactivos, y los treinta y cinco restantes (Grupo II), se encontraban en diferentes fases de la rabdomiólisis por ejercicio (15 en la fase sub aguda, 3 en la fase aguda y 17 en la fase crónica). Los resultados histoquímicos de las muestras de músculo esquelético del Grupo II, reveló en comparación al Grupo I, un daño preferencial en las fibras de contracción rápida Tipo II, disminución en la capilaridad, reflejado por la disminución significativa ($P < 0,005$) en el índice capilar y en los capilares adyacentes a las fibras Tipo IIA, e incremento significativo ($P < 0,005$) en el área promedio calculada por capilar adyacente a las fibras Tipo I, IIA y IIB. Además, en el Grupo II de caballos, mostró un incremento significativo ($P < 0,005$) en el área promedio de las fibras, así como en el área promedio de las fibras Tipo IIB. Adicionalmente, el Grupo II exhibió una disminución significativa ($P < 0,005$) en la capacidad oxidativa traducido en disminución en el % de fibras que reaccionan intensamente a la NADH-diaforasa, y en los niveles de actividad de las enzimas musculares CS y HAD. Del mismo modo, se observó en estos caballos, la pérdida de correlación entre las enzimas CS y HAD. La correlación entre los niveles de actividad sérica de las enzimas marcadoras del daño muscular CK, AST, ALT y LDH, en el Grupo II de animales,

fueron positivas y significativas ($P < 0,001$). El incremento en la actividad sérica de las enzimas CK y AST, exhibida en los CPSC del Grupo II, presentaron correlación con la fase de la rabdomiólisis. Los niveles de las mismas variaron de rangos normales en la etapa subaguda y crónica (CK: 76 UI/l-153UI/l; AST: 140UI/l-284UI/l), hasta niveles máximos en etapa aguda (CK: 172UI/l-10.000UI/l; AST: 332UI/l-15.000UI/l). Los incrementos significativos ($P < 0,005$), en los niveles de actividad sérica de la enzima AP, se relacionaron con el tipo de estrés físico al cual fueron sometidos los CPSC del Grupo II. La leucocitosis significativa ($P < 0,005$) evidenciada en el Grupo II de caballos, se correspondió con la presencia de células inflamatorias en el músculo esquelético de estos animales, observadas por las técnicas de naranja de acridina y Hematoxilina-eosina. Los hallazgos del presente trabajo, sugieren que el entrenamiento y ejercicio físico en los CPSC, debe seleccionarse, teniendo como base científica, las características atléticas propias de cada ejemplar, a objeto de evitar la aparición de la rabdomiólisis por ejercicio.

Palabras clave: Caballo Pura Sangre de Carrera, rabdomiólisis, músculo esquelético, histoquímica, bioquímica, hematología.

ABSTRACT

In order to achieve objectives in the present study, muscular biopsies were taken (by percutaneous puncture) of the *M. G. medius*, as well as blood samples from fifty-one thoroughbred horses (3-4 years old). Sixteen of these animals (Group I), were clinically healthy and inactive. The other thirty-five (Group II), were in different phases of rhabdomyolysis produced by

exercise (15 in subacute phase, 3 in acute phase, and 17 in chronic phase). Histochemistry results of samples of skeletal muscle from Group II, showed when compared with the Group I a preferential damage in Type II fibers, diminution of capillarity reflected by significant diminution ($P<0.005$) in capillary index, and in capillaries adjacent to fibres Type IIA, and significantly increased ($P<0.005$) in average fiber area calculated by capillaries adjacent to fibres Type I, IIA y IIB. Moreover, Group II horses showed significant ($P<0.005$) increment in average area of fibres, as well as in the average area of fibres Type IIB. Additionally horses of Group II exhibited a significant ($P<0.005$) diminution in oxidative capacity, manifested by diminution in % of fibres that intensively reacted to NADH-diaforase staining, and in levels of activity of muscular enzymes CS y HAD. A loss of correlation between muscular enzymes CS y HAD was also observed in these horses. The correlations between levels of serum activity in enzymes CK, AST, ALT y LDH, in Group II animals were positive and significant. ($P<0.001$). Increment in serum activity of enzymes CK y AST was seen in horses of Group II, showing correlation with this phase of rhabdomyolysis. The levels of activities of these enzymes varied from normal levels in subacute and chronic phases (CK: 76 UI/l-153UI/l; AST: 140UI/l-284UI/l), to maximum levels in acute phase (CK: 172UI/l-10.000UI/l; AST: 332UI/l-15.000UI/l). Significant increments ($P<0,005$), in the levels of serum activity of AP enzyme were related to the type of physical stress applied to horses of Group II. The significant ($P<0,005$) leucocytosis observed in Group II was associated with the presence of inflammatory cells in the skeletal muscles of animals, shown by acridine orange and Hematoxyline-eosine techniques. The findings of the present study permit us to suggest that type of training and physical exercise in thoroughbred racehorses must be chosen on a scientific basis after having the athletic characteristics of each individual, with the purpose of avoiding the appearance of exertional rhabdomyolysis.

Key words: Thoroughbred racehorses, rhabdomyolysis, skeletal muscle, histochemical, biochemical, haematological.

INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético, posee muy limitadas vías de respuesta (atrofia y necrosis segmental) a la gran diversidad de agentes químicos, físicos o biológicos que son capaces de provocar la alteración de su homeostasis celular y por ende conducir a la rabdomiólisis [30, 44, 53]. Según Gabow y col. [39], la rabdomiólisis se puede definir como un síndrome clínico y de laboratorio de etiología multifactorial, y el daño eventual reversible o irreversible de la fibra muscular esquelética, se acompaña de una alteración del sarcolema que permite la salida del contenido celular al fluido extracelular. Para Valberg y col. [109], la rabdomiólisis por ejercicio significa literalmente,

la disolución del músculo esquelético por efecto del ejercicio. A pesar de que este síndrome representa una condición patológica muy bien reconocida por propietarios y entrenadores de equinos, desde principios del siglo [76, 93, 102, 104, 118], la etiología y los procesos fisiopatológicos subyacentes, permanecen aún desconocidos [8, 43, 107].

La sintomatología de este síndrome se caracteriza por presentar en uno o en ambos miembros pelvianos, un amplio rango de alteraciones en la locomoción que van desde un envaramiento medio después de la realización de un ejercicio, hasta la inmovilización (reluctancia a moverse). Así mismo se han asociado con el síndrome tumefacción de los músculos afectados, dolor muscular a la palpación, espasmos musculares, sudoración profusa, intranquilidad, incremento en la frecuencia respiratoria, mioglobinuria, y en casos muy raros la recumbencia y la muerte [5, 8, 31, 42, 43, 47, 48, 59, 65, 74, 75, 76, 79, 92, 102, 104, 107, 109, 110, 111, 113, 115, 115, 118]. Según Beech [8], uno de los aspectos más sobresalientes de esta enfermedad, lo constituye el hecho de la característica intermitente con la cual aparecen los signos clínicos, después de la ejecución de un ejercicio físico.

En cuanto al diagnóstico de la rabdomiólisis por ejercicio, muchos autores han coincidido en señalar que este se ha basado en historia clínica y en los hallazgos físicos [8, 42, 43, 48, 75, 102, 118, 120]. El diagnóstico confirmatorio del síndrome, se ha podido obtener con las pruebas de laboratorio, donde se han detectado incrementos en los niveles plasmáticos de las enzimas marcadoras de daño muscular, como son la Creatin quinasa (CK), Aspartato aminotransferasa (AST), Aldolasa y Lactato deshidrogenasa (LDH) [5, 8, 19, 39, 42, 43, 47, 48, 49, 53, 62, 65, 92, 93, 102, 104, 112, 120]. Así mismo, Arighi y col. [5], han indicado que si la mioglobinuria no se hace evidente, el análisis de las concentraciones de mioglobina en la orina, a través de los métodos cromatográficos [6] y espectrofotométricos [12], podrían ser de gran utilidad en el diagnóstico confirmatorio del síndrome. La detección de los incrementos en las actividades séricas de las enzimas indicadas, así como en la concentración de mioglobina en la orina, se ha asociado a las alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares (sarcolema) producidas por efecto del ejercicio [8, 42, 112, 118].

Según Meginnis [76], la rabdomiólisis por ejercicio fue descrita inicialmente por Willians en 1879 en la raza de caballos de tiro, denominándose el síndrome, como enfermedad del lunes por la mañana. Hoy en día, la rabdomiólisis por ejercicio se ha descrito en otras razas de caballos como son: el Caballo Pura Sangre de Carrera (CPSC), Trottones, Árabe, Appalouosa, Cuarto de milla, y en razas mestizas [48, 74, 75, 76, 92, 104, 110, 115]. Sin embargo, este síndrome no se ha limitado específicamente a estas razas de equinos y en general al caballo, ya que existen reportes de sintomatologías similares en otras especies de animales salvajes [7], domésticos e incluso el hombre [7, 13, 25, 30, 36, 39, 46, 53, 95, 97, 119].

Por estar el ejercicio en el equino tan estrechamente relacionado con los trastornos miopáticos, la rabdomiólisis en esta especie ha sido referida con los nombres de rabdomiólisis por ejercicio [5, 9, 42, 43, 59, 65, 67, 70, 89, 92, 109, 111, 115], miopatía por ejercicio [48, 102, 104, 109] o simplemente miopatía [47]. Así mismo, los autores franceses han denominado a esta patología muscular del CPSC, como la miopatía del caballo de deporte [62]. Otros autores, basándose en la sintomatología clínica más sobresaliente de este síndrome en el caballo, como son: las alteraciones en la locomoción; los calambres de los músculos más severamente afectados (los correspondientes a las regiones lumbar, glútea y del miembro pelviano); la inmovilidad o atadura; la mioglobinuria y la hemoglobinemia, han propuesto para las denominaciones de mioglobinuria paralítica equina, mioglobinuria paroxística del caballo, miositis mioglóbínúrica, hemoglobinemia paralítica [20, 43, 50, 64, 77, 109] y síndrome de inmovilización o atadura (tying-up o cording-up) [41, 42, 47, 49, 65, 74, 76, 107, 120]. Otros autores han utilizado la denominación de azoturia [75], o bien la combinación de azoturia-tying-up [91]. Sin embargo para Meginnis [75], el término azoturia significa literalmente nitrógeno (azoe) en la orina, y es solamente en los últimos estados de un ataque severo de rabdomiólisis, cuando se incrementan los productos nitrogenados (hiperazoturia), debido a las alteraciones renales [39, 53, 78, 97]. Por lo que Meginnis [75] recomendó, la utilización del término de mioglobinuria paralítica, en lugar de azoturia. Al mismo tiempo este autor, señaló que existen diferencias significativas entre la azoturia y el tying-up (atadura), una de ellas es que la azoturia afecta a los caballos de tiro y tiene por lo general un desenlace casi siempre fatal, mientras que el tying-up afecta preferiblemente a los CPSC y trotones (raza de caballos de silla), y presenta un pronóstico favorable.

Esta variedad de denominaciones, podría ser consecuencia de concepciones encontradas entre la veterinaria clínica y la investigativa, de allí que el síndrome representa aún, un tema controversial [9, 43, 109]. Para dar una idea de la extensión del problema, es de señalar que ya en 1917 se planteaba que "ninguna enfermedad del equino ha sido sujeta a tantas teorías, hipótesis y sugerencias como ésta" [75]. Del mismo modo Stuck y Reinertson [104], puntualizaron que "el vasto número de ideas publicadas sobre la patogénesis de esta enfermedad, solamente es superada por la gran cantidad de tratamientos aplicados en el campo".

Rabdomiólisis por ejercicio equina

Incidencia

Valberg y col. [109], han indicado que son diversas las causas y opiniones contradictorias que han surgido con respecto a la incidencia del síndrome en el equino. En este sentido, se ha señalado que puede existir predisposición genética para la instauración del síndrome en el equino [70], tal aseve-

ración se ha podido corroborar en estudios relacionados con ciertos disturbios metabólicos en el equino, como son: la glucogenosis [10, 33, 45, 109, 110, 111, 112, 115, 116] y en las miopatías mitocondriales [8, 43, 110], así como también en la parálisis periódica hipercalémica [8, 24, 81, 110, 111].

Se ha señalado que los CPSC que entrenan por primera vez, son más susceptibles a sufrir de rabdomiólisis por ejercicio [8, 47, 74, 75, 109, 120]. Al mismo tiempo, se ha reportado que en los caballos de cualquier edad, sometidos a trabajos para los cuales no han sido entrenados en forma adecuada, es común observar la rabdomiólisis [5, 8, 48, 100, 104, 105]. Estos dos casos, uno correspondiente al proceso de adaptabilidad de la fibra muscular al entrenamiento [25], y el otro al estrés que sufre la musculatura esquelética por efecto de la ejecución de un ejercicio, para el cual no se ha acondicionado debidamente [36, 105], pueden producir alteraciones en el equilibrio armónico celular [30], daños en la musculatura esquelética que están en íntima relación con la intensidad, duración y tipo de trabajo al cual se sometan los músculos [8, 72, 95, 109].

Una gran incidencia de casos de rabdomiólisis por ejercicio en potros, se ha detectado por deficiencia de vitamina E y de Selenio [38, 66]. Sin embargo, otros autores como Ronéus y Hakarainen [91] consideran (sin restarle importancia al papel que juegan los antioxidantes mencionados) que existe poca correlación entre la deficiencia de estos elementos y la precipitación del síndrome en el caballo.

Hormonas tales como la progesterona, estrógeno, catecolaminas y cortisol, se han asociado con la aparición del síndrome en el caballo [112]. En este sentido, se ha reportado mayor incidencia de la rabdomiólisis por ejercicio en las yeguas [46, 75]. Sin embargo Cohen y col. [27], no encontraron en sus estudios una predisposición preferencial en las yeguas.

Las alteraciones en el funcionamiento de la glándula tiroidea, también han jugado un papel importante con la génesis del síndrome en el equino [118]. En este sentido casi el 50% de los caballos que presentaban el síndrome, fueron diagnosticados posteriormente como hipotiroideos [118].

Otras causas relacionadas con la aparición del síndrome lo constituyen el desbalance de electrolitos [8, 42, 47, 59, 100, 110], y la regulación anormal del calcio (por alteraciones en la función del sarcolema) [8, 9, 46, 67]. Con relación al desequilibrio electrolítico como factor predisponente de la rabdomiólisis por ejercicio, existen autores como Hodgson [47] que han indicado que el desbalance más que una causa predisponente, es un producto inmediato del síndrome, ya que uno de los signos del síndrome, lo constituye la sudoración profusa, debido al estrés del animal por efecto del dolor muscular. También se ha reportado una sudoración copiosa en el equino, cuando éste realiza ejercicio bajo condiciones de calor y humedad [59, 73, 100]. Esto último se ha asociado con el mencionado desbalance [42, 59, 100].

Valberg y col. [109], han indicado que en el humano, más del 50% de los casos de rabdomiólisis por ejercicio, están relacionados con trastornos en el metabolismo energético en el músculo esquelético. Una aproximación análoga, se ha detectado en los caballos en la deficiencia de las enzimas mitocondrial NADH CoQ reductasa [109], y fosfofructuquinasa [109, 110, 113, 114].

Por otra parte, los defectos en el acoplamiento de la excitación-contracción en la fibra muscular esquelética, también se han relacionado con la aparición del síndrome [9].

Por último, existen factores ambientales que pueden contribuir a la instauración del síndrome en el equino, entre ellos son dignos de mencionar: temperaturas ambientales frías acompañadas con humedad y fango (condiciones resbaladizas) [92], condiciones inapropiadas de la pista [23, 27, 35, 54], y la elaboración (diseño y materiales) de las herraduras [54].

Etiopatogenia

La fisiopatología de la rabdomiólisis por ejercicio en el equino, permanece aún en la obscuridad [8, 43, 109]. A pesar de esto, se ha aceptado hasta el momento que se trata de una entidad patológica en la cual están involucradas la producción y el acúmulo excesivo de ácido láctico, combinado con una hipoxia local del músculo durante el ejercicio [9, 17, 20, 74, 75, 76, 89, 104, 118]. Lindholm y col. [65] y McEwen y Hullan [74] han asegurado que un descenso del flujo sanguíneo en el músculo esquelético durante el ejercicio puede producir una hipoxia local, seguida de una reversión hacia el metabolismo anaeróbico, con formación y acumulo de ácido láctico en el interior de las fibras. Además, estos mismos autores, han propuesto que las fibras de contracción rápida (Tipo II), son las más involucradas en la condición patológica, probablemente, debido a que presentan una serie de características que las diferencian de las fibras de contracción lenta (Tipo I), como son: < irrigación sanguínea [44], así como una capacidad de almacenamiento de glucógeno [64]. Según Hodgson [47], debido a estas dos características básicas de las fibras Tipo II, se ha podido sugerir que el ácido láctico producido durante el ejercicio por este tipo de fibra, es removido de forma muy lenta, acentuándose este fenómeno en los animales que comienzan el entrenamiento, o que son sometidos a pruebas para las cuales no estaban debidamente entrenados. En asociación con el acúmulo excesivo del ácido láctico, se han reportado además: \uparrow en las concentraciones de $[H^+]$, $\uparrow CO_2$ [16, 121] \downarrow de pH intracelular [17] y \downarrow ATP [65] entre otros cambios. Tales condiciones, son las más propicias para: \uparrow en el catabolismo proteico (debido a los cambios redox intramiocelulares) [86], \uparrow en la producción de amonio (debido a la activación de la enzima AMP desaminasa) [34, 80], \uparrow del ácido úrico [55], y concomitantemente con esto, la lisis de la fibra muscular [36, 45, 86, 119].

La hipoxia local también puede acarrear una serie de alteraciones morfológicas en las mitocondrias [51], y aún cuando

estos organelos den una reacción positiva a las enzimas oxidativas por métodos histoquímicos, es posible que en ellos, la fosforilación oxidativa se encuentre sólo ligeramente acoplada o desacoplada, comprometiéndose la producción de ATP [61].

Por otra parte, se ha señalado que la falla en los mecanismos de protección del músculo esquelético a los efectos tóxicos de los radicales libres producidos durante el ejercicio puede causar daños irreversibles en las fibras musculares [57, 60]. En este sentido, se ha indicado que debido a la actividad de los radicales libres (lipoperoxidación) sobre las membranas celulares y subcelulares, se puede producir alteraciones en la permeabilidad de las mismas provocando la introducción de Ca^{2+} al citosol [8, 60]. Los mecanismos de protección incluyen entre otros las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) [57, 60]. La deficiencia de los mecanismos indicados, es más manifiesta en las fibras Tipo II que en las Tipo I, ya que éstas últimas además de tener mayor capacidad oxidativa, poseen grandes cantidades de catalasa [60]. Esta enzima según Krotkiewski y Brzezinska [60], está catalogada de gran importancia en los procesos de desintoxicación producidos por peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Por otra parte, es interesante señalar que durante el proceso de isquemia y reperusión, se puede producir una disminución en la actividad de las enzimas protectoras del estrés oxidativo [60].

Las alteraciones mencionadas en la permeabilidad del sarcolema (producto de la lipoperoxidación), puede perturbar la homeostasis del Calcio (Ca^{2+}) intramiocelular, trayendo como consecuencia la proteólisis, y por ende la muerte celular [9, 46, 67, 101].

Además de los aspectos analizados, se ha indicado que las alteraciones observadas en las fibras musculares esqueléticas por el ejercicio, podrían estar también asociadas al efecto mecánico de tracción excéntrica, que se ejerce sobre las fibras musculares esqueléticas, durante la ejecución del ejercicio [36, 37, 63].

Lesiones

Macroscópicas: Las principales masas musculares afectadas por el síndrome, exhiben después de un ataque de rabdomiólisis por ejercicio, una tumefacción media, y la presencia de franjas o zonas pálidas de tejido [48, 118].

Histológicas: Los análisis bajo un microscopio de luz, revelan que la tumefacción media, se debe a un edema intersticial. Así mismo, las franjas pálidas de tejido, son fibras musculares esqueléticas que han perdido mioglobina. Además de lo indicado, se han reportado como lesiones: la fragmentación de las fibras, la degeneración hialina, la calcificación, y la presencia de células inflamatorias. Adicionalmente, otro hallazgo histológico lo ha constituido la regeneración [3, 5, 7, 48, 65, 74, 118].

Ultraestructurales: Estas se pueden resumir en: alteraciones mitocondriales y del sistema sarcotubular; degeneración miofibrilar y de los capilares intramusculares; necrosis segmental e infiltración de células inflamatorias [5, 65, 82, 105, 112].

Evaluación histoquímica

De los trabajos histoquímicos realizados por Lindholm y col. [65] y corroborados por Mc Ewen y Hulland [74], ha emergido la idea que los cambios miodegenerativos producidos por el ejercicio físico, se acentúan más en las fibras de contracción rápida o Tipo II. Al mismo tiempo, con el análisis histoquímico de las enzimas fosfatasa alcalina (AIPasa), fosfatasa ácida (AcPasa) y esterasa, se ha podido realizar una evaluación histoquímica de los cambios miodegenerativos de las fibras Tipo II, así como evidenciar la presencia de lisosomas [3, 65, 115]. Además de esto, Van den Hoven [115], ha reportado con el uso de los métodos histoquímicos, la aparición (al octavo día aparición del conjunto de síntomas que acompañan a la rabdomiólisis por ejercicio en el equino), de fibras que reaccionan a las enzimas denominadas NADPH regenerantes (malato NADP⁺ Oxidorreductasa; isocitrato NADP⁺ Oxidorreductasa; glucosa-6-fosfato NADP⁺ Oxidorreductasa), pertenecientes a la vía de las pentosas fosfato. Según este autor, debido a la crisis energética que sufren las fibras musculares esqueléticas por los daños a nivel mitocondrial, se activa en las fibras en regeneración, una vía alterna de producción energética, como lo representa, la vía de la pentosa fosfato.

Por otra parte, los análisis histoquímicos realizados a biopsias musculares de caballos que sufren de glucogenosis por deficiencia de la enzima fosfo fructoquinasa (PKF), han detectado la presencia de vacuolas subsarcoplásmicas e intracitoplasmáticas en las fibras Tipo II. Estas vacuolas reaccionan intensamente al PAS y son resistentes a la digestión con α -amilasa [109, 110, 113, 114].

El músculo esquelético del CPSC (más que el de cualquier otro animal doméstico), está expuesto a eventuales injurias, debido a las exigencias que de forma constante, se le imprimen a estos órganos activos de la locomoción. Por esto, el músculo esquelético de esta raza de equinos, constituye un interesante modelo de análisis de plasticidad de cambios de adaptación fisiológica al estímulo del ejercicio [40], así como también para interpretar los cambios miodegenerativos ocurridos por el efecto del ejercicio físico. En este contexto de ideas, la falta en Venezuela de una verdadera coordinación entre el hipismo como deporte y las bases fisiológicas del mismo, conlleva a la no-existencia de criterios estandarizados sobre el tipo de entrenamiento que debe emplearse, de acuerdo a las características atléticas propias de cada ejemplar. Esto último motivó la presente investigación, con la cual se intentó dilucidar las diferentes etapas del proceso de rabdomiólisis por ejercicio en el CPSC venezolano, tomando en consideración además que por el carácter multifactorial del síndrome [39], muy probablemente existen en el país una serie de factores predis-

ponentes tales como son: las condiciones climáticas (calor y humedad); las características de la pista de carrera; y tipo de entrenamiento, manejo y alimentación que reciben los CPSC criollos, que en forma integral o aislada inciden y hacen más proclives a nuestros ejemplares, a sufrir injurias en el sistema locomotor. Para alcanzar los objetivos del presente trabajo, se empleó desde un punto de vista integracionista varias herramientas metodológicas utilizadas en los estudios miológicos, como lo constituyen: la histoquímica, bioquímica y niveles séricos de las enzimas marcadoras del daño muscular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Para realizar la presente investigación se tomaron muestras del *M.G.medius* (biopsias por punción percutánea) y de sangre (por venipuntura de la *V. jugularis externa*) a cincuenta y un (51) yeguas de edades comprendidas entre 3-4 años. Se analizaron dos (2) grupos de ejemplares. El Grupo I, fue de dieciséis (16) yeguas CPSC criollas que se encontraban para el momento del muestreo en condiciones inactivas por un período de noventa (90) días y clínicamente sanas. Este grupo control de animales, se ubicó en el Haras "Los Samanes", situado en Belén, Edo. Carabobo. El Grupo II de CPSC, se encontraba para el momento de la toma de las muestras, en fase de entrenamiento en el Hipódromo "La Rinconada" en la ciudad de Caracas. El Grupo II de animales, estaba integrado por treinta y cinco (35) ejemplares que presentaban diferentes fases de la rabdomiólisis por ejercicio, quince (15) en la fase subaguda del síndrome, tres (3) en la fase aguda y diecisiete (17) en la fase crónica. A cada animal se le abrió una historia clínica que contemplaba además de la reseña, los resultados de los análisis clínicos, los tratamientos farmacológicos prescritos, así como la evolución de la enfermedad.

Muestras de músculo

Las muestras se tomaron de la porción ventral del *M. G. medius*, siguiendo la técnica de biopsia muscular por punción percutánea descrita por Lindholm y Piehl, [64]. Se utilizó para la toma de las muestras, la aguja de biopsia muscular diseñada por Bergström [10]. Todas las muestras de músculo, fueron obtenidas a una profundidad (aprox. 6 cm) y en un área similar, considerando para ello referencias anatómicas concretas, sugeridas por López-Rivero y col. [68].

Análisis histoquímico

Los especímenes de biopsia muscular destinados para histoquímica, se montaron en discos de corcho cubiertos con papel de aluminio y fueron cubiertas con el medio de embebimiento OCT (Tissue tek., Miles Sci USA) sumergiéndose luego en isopentano en frío (-60°C) por 2-3 minutos. Posteriormente, las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Se realizaron secciones transversales seria-

das de un espesor de 6μ (para el anaranjado de acridina [87] y 10μ en un criostato (marca Cryo-cut, Amerian Optical Corporation) a -20°C , siendo montadas sobre una laminilla o cubreobjeto, para realizar las reacciones histoquímicas para la Adenosina trifosfatasa miofibrilar (ATPasa miosínica), a un pH de preincubación alcalino (10,3) Padycula y Herman [85], y pHs de preincubación ácido (4,8, 4,6 y 4,37) Brooke y Kaiser [15]; y reacción para la Nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH-diaforasa) [84].

Los capilares, se visualizaron utilizando el método recomendado por Henckel [44], basado en la presencia de mucopolisacáridos que reaccionan con el PAS, tiñéndose tanto el glucógeno de las fibras como la membrana basal del endotelio capilar. Para observar los capilares, el glucógeno previamente es digerido por la α -amilasa-PAS, quedando identificados los mucopolisacáridos de la membrana basal de las fibras y de los capilares [1].

Sobre las micrografías en blanco y negro, tomadas a esta reacción (α -amilasa-PAS) y con la ayuda de un analizador de imágenes (LADD Microcomputer Graphic Data Analyser System), se determinó el área promedio de cada tipo de fibra (I, IIA y IIB). La densidad capilar (capilares/ mm^2), el índice capilar (N° de capilares/ N° de fibras), el N° de capilares adyacentes a cada fenotipo de fibra (I, IIA y IIB), siguiendo el protocolo descrito por Brodal y col. [14]. Adicionalmente, se calculó el área promedio capilar adyacente a cada tipo de fibra (I, IIA y IIB).

La clasificación de los miofenotipos de fibras, se realizó según la nomenclatura propuesta por Brooke y Kaiser [15] (Tipos I, IIA y IIB). Además, también se tomó en consideración las recomendaciones de Andrews y Spurgeon [2], contándose un mínimo de 200 fibras en cada muestra.

El potencial metabólico oxidativo de las fibras musculares esqueléticas, se estimó como alto (A), medio (M) o bajo (B), dependiendo de las intensidades de reacción para la Nicotinamida adenina dinucleótido reducida (NADH-diaforasa), FIG. 1.

Citoquímica

Para la visualización de los macrófagos, así como de los lisosomas dentro de las fibras musculares esqueléticas afectadas por el síndrome, se utilizó el naranja de acridina (3,6-bis-dimetilamino-caridina) [87], ya que este colorante ha demostrado tener afinidad por las hidrolazas ácidas lisosomales [18, 30].

Histología

Las observaciones de las alteraciones morfológicas de las fibras musculares esqueléticas, así como la presencia de infiltrados celulares, se realizaron usando la tinción Hematoxilina-eosina [32].

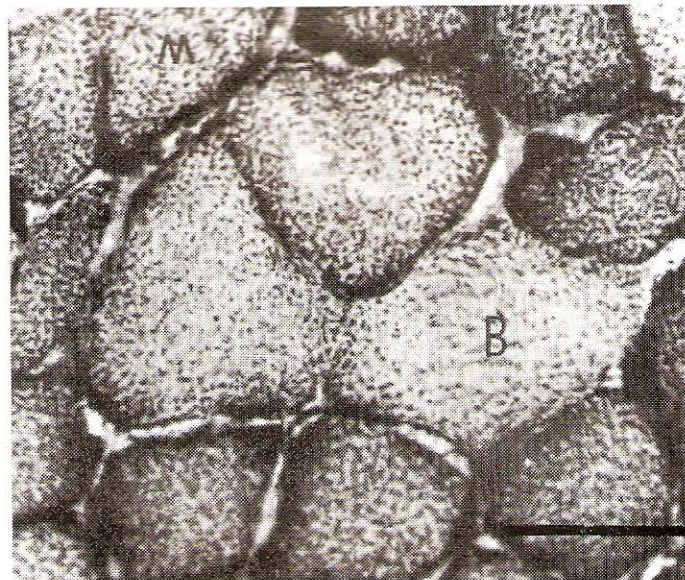


FIGURA 1. EN ESTA MICROGRAFÍA SE ILUSTRAN LA REACCIÓN HISTOQUÍMICA PARA LA NADH-diaforasa EN UNA SECCIÓN TRASVERSAL CORRESPONDIENTE A UN CABALLO DEL GRUPO I. NÓTESE LA PRESENCIA DE FIBRAS QUE REACCIONAN INTENSAMENTE (A), MEDIANAMENTE (B) Y DE FORMA BAJA (B) A LA NADH-diaforasa. LA BARRA REPRESENTA 100m.

Análisis bioquímico

Las muestras destinadas para este fin, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se colocaron en papel de aluminio, luego se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su análisis.

Las actividades de las enzimas analizadas fueron: citrato sintetasa (CS: En 4.1.3.7) (como un marcador del potencial oxidativo mitocondrial) y la β -Hidroxiacil.CoA- deshidrogenasa (HAD: En 1.1.1.35) (como un marcador del potencial lipolítico). Las actividades de estas enzimas, se analizaron usando la técnica fluorométrica descrita por Lowry y col. [69], a 25°C , expresando los resultados en: M/ min. X gramo de peso húmedo de tejido.

Muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por venipuntura de la *V. jugularis externa* de los animales analizados, tomándose aproximadamente 10 mL de sangre (por duplicado) en tubos estériles al vacío. Uno de los tubos contenía EDTA Na₂ (anticoagulante), para el análisis de los parámetros hematológicos: Es importante señalar que para la toma de las muestras, se siguieron las recomendaciones de Stewart y col. [103], en cuanto a que durante la recolección de las muestras de sangre en el equino, se debe evitar la excitación del ejemplar, ya que podría producir falsos incrementos en el hematocrito, hematies y hemoglobina, atribuido esto último a la contracción esplénica, seguida de una estimulación simpática o adrenérgica.

ca. Del mismo modo, y siguiendo las sugerencias de Collins [28], las muestras de sangre se tomaron a ejemplares que para el momento del muestreo no se hubieran sometido a ejercicio reciente (aprox. 24 horas). Por último las muestras de sangre, se obtuvieron en todos los animales en reposo, previo a la toma de las biopsias de músculo. Tales precauciones evitaron posibles alteraciones en los valores bioquímicos sanguíneos y hematológicos.

Química del suero

Cada muestra de sangre destinada para la determinación de la actividad de las enzimas séricas, se centrifugó a 3.000 RPM por 20 minutos en una centrífuga marca Damon IEC-HN-SII. El suero obtenido se almacenó en congelación a -20° , por un tiempo máximo 3 días, hasta su posterior análisis [11]. La determinación de la actividad de las diferentes enzimas en las muestras de suero se realizó mediante métodos colorimétricos. Usando kits comerciales (Laboratorio Wiener) y la lectura se realizó en un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-120-020.

1. Se determinaron los niveles séricos de las enzimas siguientes: creatin quinasa (U.I.B. 2.7.3.2.; CK), aspartato amino transferasa (U.I.B. 2.6.1.1.; AST), alanina aminotransferasa (U.I.B. 2.6.1.2.; ALT), lactato deshidrogenasa (U.I.B. 1.1.1.27; LDH) y fosfatasa alcalina (U.I.B. 3.1.3.1; AP). Los resultados se expresaron en Unidades Internacionales (UI)/litro.

2. Se analizaron las concentraciones séricas de Na^+ , K^+ y Cl^- , a través de un fotómetro de llama, expresando los resultados en mEq/L.

Pruebas hematológicas

1. Se determinó la concentración de hemoglobina, usando un hemoglobímetro marca Coulter Electronic, expresando los resultados en g/L.

2. El hematocrito se determinó, usando el método microhematocrito, los resultados se expresaron en porcentaje (%).

3. El conteo de glóbulos rojos y blancos, se realizó a través de un contador electrónico marca Coulter Counter (Coulter Electronics), modelo FZ 40, expresando los resultados del

conteo glóbulos rojos $\times 10^{12}/\text{L}$, y el de los glóbulos blancos $\times 10^9/\text{L}$.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de "t" de student para comparar parejas de grupos [83]. Las correlaciones, se obtuvieron por el método de los cuadrados mínimos [83].

RESULTADOS

Tipos de fibras

La identificación de los tipos de fibras musculares sobre la base de las reacciones a la ATPasa miofibrilar, a pHs de preincubación alcalino y ácido, permitió establecer en las muestras analizadas tres (3) tipos de fibras musculares que de acuerdo con la clasificación de Brooke y Kaiser 15, corresponden a las fibras Tipo I, IIA y IIB. Así mismo, los estudios de las muestras revelaron un aumento significativo ($P < 0,005$) en el porcentaje de fibras Tipo IIA y una disminución de igual significación en % de fibras Tipo IIB, al cotejar al Grupos II, con los ejemplares del Grupo I, TABLA I.

Potencial metabólico oxidativo

En la TABLA II, se muestran los resultados del análisis cualitativo (expresado en %), del potencial metabólico oxidativo de las fibras musculares correspondientes a las muestras analizadas. En esta TABLA II, se hace evidente que en los ejemplares del Grupo II, el % de fibras que reaccionan de forma intensa a la NADH-diaforasa, han disminuido de forma significativa ($P < 0,005$), con relación a los Grupos I. Así mismo, al comparar el % de fibras que reaccionan de forma mediana a la NADH-diaforasa, entre los dos grupos de animales estudiados, se observó un aumento significativo ($P < 0,005$) de este tipo de fibras en los caballos del Grupo II, con relación a los Grupos I. En este sentido, al establecer la correlación entre los % de fibras alta y medianamente oxidativas, entre las medianamente oxidativas con las de reacción baja a la NADH-diaforasa correspondientes a los caballos

TABLA I
PROMEDIO \pm ES, DE LOS TIPOS DE FIBRAS EXPRESADOS EN PORCENTAJE (%) EXISTENTES EN EL *M.G.medius* DE UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPREDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupos CPSC	Fibras tipo (%)		
	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
Grupo I (n=16)	10,04 \pm 0,57	33,68 \pm 0,20	55,23 \pm 0,37
Grupo II (n=35)	10,33 \pm 0,14	55,47 \pm 0,26***	34,57 \pm 0,21***

*** $P < 0,005$

del Grupo II, se observó que fueron negativas y significativas ($P < 0,01$), TABLA XII.

Área promedio de los tipos de fibras

El análisis de las microfotografías tomadas a la reacción α -amilasa-PAS, determinó que existe un aumento significativo ($P < 0,005$) en el área promedio de las fibras en los caballos del Grupo II, en comparación con el correspondiente a los ejemplares del Grupo I. Por otra parte, se evidenciaron aumentos significativos ($P < 0,005$) en el área promedio de las fibras Tipo I y Tipo IIB, pertenecientes a los caballos del Grupos II, con las pertenecientes a los del Grupo I de caballos, TABLA III.

Capilaridad

Los resultados del análisis estadístico de la densidad capilar (cap./mm^2) e índice capilar ($N^\circ\text{cap./N}^\circ\text{fibras}$), capilares adyacentes a cada tipo de fibra (I, IIA y IIB) y el área promedio calculada por capilar adyacente a cada tipo de fibra (I, IIA y IIB), se exhiben en las TABLAS IV, V y VI. El análisis de tales variables revelaron que existe una disminución significativa en la capilaridad de los ejemplares del Grupo II, con relación a los caballos de los Grupos I. En este sentido, se evidenciaron disminuciones significativas ($P < 0,005$), en el índice capilar, TABLA IV, y en capilares adyacentes a las fibras Tipo IIA ($P < 0,005$), en el Grupo II de caballos, con respecto al Grupo I, TABLA V. Así mismo, se observó un incremento significativo ($P < 0,005$), en el área calculada por capilar adyacente a las fibras Tipo I, IIA y IIB, en el Grupo II, al compararlas con el Grupo I, TABLA VI. Por otra parte, el efecto del entrenamiento en el Grupo II de caballos, se reflejó por un incremento significati-

vo ($P < 0,005$) en la densidad capilar, al cotejar esta variable con el Grupo I, TABLA IV.

Análisis bioquímico

En la TABLA VII, se exhiben los resultados del análisis de las determinaciones de las enzimas musculares (expresadas en $\text{Mmol/min} \times \text{g}$ de peso húmedo de tejido: citrato sintasa (CS) y β -Hidroxilacil-CoA-deshidrogenasa (HAD). En esta TABLA VII, es evidente la disminución significativa ($P < 0,005$) en los niveles de actividad de las enzimas CS y HAD, correspondientes a los ejemplares del Grupo II, con relación a los caballos de los Grupos I. Al establecer la correlación entre las actividades de las enzimas musculares HAD y CS en los grupos de caballos, se observó que dicha correlación perdía significación en el Grupo II de animales, al comparar con la existente en los ejemplares del Grupo I, TABLA XI.

Análisis de ciertos parámetros bioquímicos a nivel sérico

1. Análisis de la actividad sérica de creatin quinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (AP). Como muestra la TABLA VIII, las concentraciones séricas de la enzima AP, correspondientes al Grupo II de ejemplares, presentó un incremento significativo ($P < 0,005$), con relación a los niveles de actividad de esta enzima, en los Grupos I. Además, se evidenció un incremento en el Grupo II de caballos, para los niveles de actividad séricas de la enzimas CK y AST, con relación al otro grupo de caballos.

En otro orden, al establecer las correlaciones entre los niveles de la enzima AP y los correspondientes a las enzimas

TABLA II

PROMEDIO \pm ES, REACCIÓN HISTOQUÍMICA DE LAS FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS A LA ENZIMA NADH-diaforasa, EXPRESADO EN PORCENTAJE (%) EXISTENTES EN EL *M.G.medius* DE UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupos CPSC	% NADH-diaforasa *		
	Alta	Media	Baja
Grupo I (n=16)	24,60 \pm 0,58	34,80 \pm 0,96	29,57 \pm 0,54
Grupo II (n=35)	12,52 \pm 0,28 ***	58,18 \pm 0,33 ***	23,66 \pm 0,47

*** $P < 0,005$

TABLA III

PROMEDIO \pm ES ÁREA PROMEDIO DE LOS TIPOS DE FIBRAS (I, IIA Y IIB) EXPRESADAS EN m^2 EXISTENTES EN EL *M.G.medius* DE UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupos CPSC	Área promedio de las fibras (μm^2)	Área		
		Tipo I	Promedio de Tipo IIA (μm^2)	Tlpos de fibras Tipo IIB
Grupo I (n= 16)	3.001,86 \pm 643,26	2.080,24 \pm 696,51	2.816,92 \pm 714,62	4.729 \pm 1.147,89
Grupo II (n= 35)	4.277,70 \pm 1415,97***	3.002,24 \pm 663,33	3.066,58 \pm 992,66	6.314,95 \pm 2.480,59***

*** $P < 0,005$

TABLA IV

PROMEDIO \pm ES, DE LA DENSIDAD CAPILAR (cap./mm²) E INDICE CAPILAR (N° cap./N° fibras), EXISTENTES EN EL *M.G. medius* DE UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS, (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupos CPSC	Densidad capilar (cap./mm ²)	Índice capilar (N°cap./N°fibras)
Grupo I (n= 16)	436,75 \pm 7,12	2,11 \pm 0,019 ***
Grupo II (n= 35)	614,31 \pm 8,4 ***	1,80 \pm 0,016

*** P< 0,005

TABLA V

PROMEDIO \pm ES, NÚMERO DE CAPILARES ADYACENTES A CADA TIPO DE FIBRA (I, IIA Y IIB) EXISTENTES EN EL *M.G. medius* DE UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS, (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupos CPSC	CAP.	Aday. A Cada Tipo		De Fibra
	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB	Tipo IIB
Grupo I (n= 16)	4,38 \pm 0,05	5,15 \pm 0,05		5,30 \pm 0,07
Grupo II (n= 35)	5,07 \pm 0,051	4,39 \pm 0,028***		5,34 \pm 0,04

*** P<0,005

TABLA VI

PROMEDIO \pm ES, ÁREA PROMEDIO CALCULADA POR CAPILAR ADYACENTE A CADA TIPO DE FIBRA (I, IIA Y IIB), EXPRESADAS EN μmm^2 EXISTENTES EN EL *M.G. medius* DE UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS, (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupos CPSC	Área promedio	Calculada por CAP Tipo de fibra (μmm^2)	Ady. A Cada
	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB
Grupo I (n= 16)	516,08 \pm 10,35	553,12 \pm 9,3	696,64 \pm 8,8
Grupo II (n= 35)	606,19 \pm 7,9 **	709,06 \pm 11,43 ***	1.194,96 \pm 24,7 ***

** P<0,01; *** P<0,005

AST y ALT, en el Grupo II de caballos, no se observó correlación entre estas variables. Esto mismo, se evidenció en los caballos de los Grupos I, TABLA XII. Sin embargo, al establecer correlación entre los niveles de actividad sérica entre las enzimas CK, AST, ALT y LDH en el Grupo II de animales, estas fueron positivas y significativas (P<0,001), TABLA XI.

2. Con relación a los valores séricos de los electrolitos Na⁺, K⁺ y Cl⁻ (expresados en mEq/l) analizados en la presente investigación, se exhiben en la TABLA IX. Se puede observar que existe en el Grupo II de caballos, un nivel sérico para el Na⁺ mayor significación (P<0,025) que el que presentan los caballos del Grupo I.

Análisis hematológico

En la TABLA X, se muestran los resultados del análisis hematológico (hematíes, hematocrito, hemoglobina y leucocitos). Se puede observar que los caballos del Grupo II, presentan una leucocitosis altamente significativa (P<0,005), así como un aumento no significativo (P<0,05), en la concentración de hemoglobina, con relación al Grupo I de ejemplares.

TABLA VII

PROMEDIO \pm ES, DE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS MUSCULARES CITRATO SINTETASA (CS) Y β -OH-ACYL-CoA DESHIDROGENASA (HAD), EXPRESADAS EN (mol/g/minuto), EXISTENTES EN EL *M.G. medius* DE UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS, (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupos CPSC	CS	HAD
Grupo I (n=5)	25,87 \pm 0,64	12,36 \pm 6,51
Grupo II (n=10)	4,33 \pm 2,38 ***	5,29 \pm 2,9 ***

DISCUSIÓN

La selectividad del daño a las fibras de contracción rápida (Tipo II) evidenciada en los ejemplares del Grupo II, por la rabdomiólisis por ejercicio, concuerda con descripciones previas de la enfermedad en el equino [5, 47, 48, 65, 74, 92, 104,

TABLA VIII

PROMEDIO ± ES, DE LAS ACTIVIDADES SÉRICAS DE LAS ENZIMAS CREATIN QUINASA (CK), LACTATO DESHIDROGENASA (LDH), ASPARTATO AMINO TRANSFERASA (AST), ALINA AMINOTRASFERASA (ALT) Y FOSFATASA ALCALINA (AP), EXPRESADAS EN UI/L, EXISTENTES EN UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS, (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupo CPSC	CK	LDH	AST	ALT	AP
Grupo I (n= 16)	198,21 ± 7,9	198,54 ± 7,7	271 ± 4.2	15,5 ± 0,43	124,4 ± 2,8
Grupo II (n= 35)	612,60 ± 47,4	202,30 ± 2,1	390,3 ± 14,05	34,4 ± 1,29	178,9 ± 2,02 ***

*** P< 0,005

TABLA IX

PROMEDIO ± ES, DE LOS NIVELES SÉRICOS DE LOS ELECTROLITOS Na⁺, K⁺ Y CL⁻ EXPRESADOS EN mEq/l, EXISTENTES EN UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS, (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupo CPSC	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Grupo I (n= 16)	133,8 ± 0,28	3,57 ± 0,045	100,86 ± 0,55
Grupo II (n= 35)	135,9 ± 0,13 *	3,71 ± 0,022	101,33 ± 0,3

* P< 0,025

TABLA X

PROMEDIO ± ES, DE LOS NIVELES HEMATOLÓGICOS (HEMATÍES, HEMATOCRITO, HEMOGLOBINA Y LEUCOCITOS) EXISTENTES EN UNA MUESTRA DE CINCUENTA Y UN (51) CABALLOS PURA SANGRE DE CARRERA VENEZOLANOS, DE EDADES COMPRENDIDAS ENTRE 3-4 años (Grupo I) INACTIVOS, (Grupo II) CON RABDOMIÓLISIS

Grupos CPSC	Hematíes (X 10 ² /l)	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	Leucocitos (X 10 ⁹ /l)
Grupo I (n= 16)	7,11 ± 0,1	40,11 ± 0,45	13,87 ± 0,18	7,05 ± 0,13
Grupo II (n= 35)	7,13 ± 0,04	41,40 ± 0,20	14,89 ± 0,05	8,83 ± 0,07 ***

*** P< 0,005

115, 118]. Observaciones similares, se han realizado durante el estudio de la rabdomiólisis por ejercicio en el hombre [36, 37] y en el conejo [63]. Sin embargo, Salminen y Kilhström [95] reportaron en ratones sometidos a ejercicios de resistencia que las partes profundas de los músculos vasto medial, vasto lateral, y especialmente vasto intermedio, junto con el músculo sóleo y la porción profunda del músculo tibial anterior, fueron las más afectadas. Es importante hacer la acotación de que en las partes profundas de los mencionados músculos y muy particularmente en el músculo soleo, predominan las fibras de contracción lenta o del Tipo I [95]. Salminen y Kilhström [95] señalaron además que esta propensión al daño en las partes profundas (rojas) de los músculos citados, se deba a un síndrome de compresión isquémica, que de forma particular afecta los compartimientos no expansibles de los músculos, como lo constituyen las partes rojas de éstos. De allí que estos autores propusieran que los daños exhibidos, son del tipo inducido por hipoxia y no del tipo mecánico. A diferencia de lo señalado para la rabdomiólisis por ejercicio en el hombre, donde las lesiones en las fibras musculares, son del tipo mecánico o una combinación hipoxico-mecánico [36]. Por otra parte la selectividad del daño de las fibras Tipo II, se ha señalado en la tenotomía [116]; la desnervación [33]; el desu-

so [71]; la isquemia [53]; en las glucogenosis por deficiencia de maltasa ácida [50] en la deficiencia de la enzima fosfofructoquinasa [109, 110, 113, 114]; el hipotiroidismo [58]; el aldosteronismo primario [58]. La miopatía de etiología desconocida con agregados tubulares en las fibras Tipo II [78]; la miastenia gravis [26] y la administración crónica de dantrolene sódico [99].

La disminución significativa (P<0,005) en el % de fibras que reaccionan intensamente a la NADH-diaforasa (lo cual se interpretó como una disminución en la actividad mitocondrial, causada por la rabdomiólisis), evidenciada en el Grupo II de caballos, TABLA II, se acompañó en algunos ejemplares de este grupo, con una disminución en el área promedio de las fibras Tipo IIA, y de un incremento significativo (P<0,005) en el grosor de las fibras Tipo IIB, TABLA III. Estos resultados se corresponden con los reportes previos de McEwen y Hulland [74] y Van den Hoven y col. [115] en CPSC afectados por el síndrome. De igual modo, y en concordancia con los autores citados, los CPSC afectados por la rabdomiólisis por ejercicio analizados en la presente investigación, presentaron un incremento significativo (P<0,005) en el % de fibras que reaccionan de forma media a la NADH-diaforasa. Dichas fibras (de reacción media a la NADH-diaforasa), estaban constituidas en su

TABLA XI
CUADRO MATRIZ DE CORRELACIONES

	Tipos de fibras (%)			NADH-diaforasa (%)			NADH-diaforasa (%)			Enzimas Séricas (UI/l)			
	I	IIA	IIB	A	M	B	CS	HAD	CK	AST	ALT	LDH	AP
IIA	-,50 *												
IIB	-,82 **	,05											
A	,14	,20	-,16										
G M	-,12	-,24	,17	-,82 **									
R B	-,32	,21	,39	-,18	-,25								
U CS	,28	,16	-,25	,19	-,11	-,04							
P HAD	11	-,18	-,26	,34	,02	-,56	,58 *						
O AST										,41			
I ALT										,48	,29		
LDH										,42	-,10	,15	
AP										-,36	-,47	,23	,25
IIA	-,74 **												
IIB	-,50 **	-,21											
A	,45	-,31	-,25										
G M	-,21	,17	,10	-,58 **									
R B	-,21	-,21	,14	-,34	-,56 **								
U CS	,16	,09	-,39	-,02	,11	-,07							
P HAD	,51 *	-,09	-,72 **	,38	-,33	,09	,38						
O AST										,99 **			
II ALT										,99 **	,99 **		
LDH										1**	1**	1**	
AP										-,08	-,07	-,15	-,08

** P<0,01; * P<0,05

gran mayoría por fibras Tipo IIA, anormalmente pequeñas, FIG. 2. Observaciones similares, se han reportado en la des-nervación [90], la atrofia espinal crónica [53] y en la isquemia [61]. Contrariamente a lo indicado, en la miopatía experimental por cortisona, Vignos y Greene [117] reportaron un incremento en la intensidad de reacción histoquímica a las enzimas oxidativas. Según señalan estos autores, tal fenómeno obedece a un mecanismo compensatorio del músculo a las alteraciones metabólicas inducidas por el esteroide.

La disminución en el % de fibras que reaccionan intensamente a la NADH-diaforasa, en el Grupo II de ejemplares, se acompañó desde el punto de vista bioquímico, con una disminución de igual significación (P<0,005) en los niveles de las enzimas oxidativas citrato sintetasa (CS) y β-Hidroxi-acil-CoA-deshidrogenasa (HAD), TABLA VII. Estas disminuciones, en conjunto con la pérdida de correlación entre los niveles de actividad de las enzimas CS y HAD, TABLA XI, sugieren una marcada perturbación metabólica en la oxidación del sustrato terminal en estos caballos afectados por el síndrome. Estos hallazgos que coinciden con los presenta-

dos en trabajos relacionados con procesos miodegenerativos de diferente etiología, tales como la miopatía por deficiencia energética [77], la miopatía por efecto de la crotoxina [98], miopatía isquémica [51], miopatías mitocondriales [4], y miopatías tirotóxicas [58]. En concordancia con estos trabajos, tales hallazgos permiten sugerir que en los procesos miodegenerativos, donde han ocurrido alteraciones en las mitocondrias, se puede producir un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, traduciéndose esto en una crisis energética en el ámbito de las fibras musculares esqueléticas.

Las grandes desviaciones estándar observadas en el área promedio de las fibras en los ejemplares del Grupo II (4.277,7 ± 1.415,9 μm²), TABLA III, probablemente obedezcan, a la presencia de fibras Tipo IIA atroficas (rango de grosor 874 m² - 5.005 m²) y fibras Tipo IIB con posible edema (rango de grosor 2.091m²- 11.222.2 m²), en algunos caballos Tales hallazgos apoyan las sugerencias de otros autores que han indicado que el ejercicio físico extremo, es capaz de producir fibras musculares anormalmente pequeñas (atrofiadas, degene-

radadas, ó en proceso de regeneración) [45, 105, 119], ó bien fibras musculares esqueléticas edematosas [13].

Con relación a la capilarización en el Grupo II, las variables índice capilar, TABLA IV, capilares adyacentes a las fibras Tipo IIA, TABLA V y área promedio por capilar adyacente a las fibras Tipo I, IIA y IIB, TABLA VI, revelaron una disminución marcada en la capilaridad de estos ejemplares, al cotejar éstas variables, con las correspondientes a los caballos sanos e inactivos (Grupo I). Observaciones similares a la disminución en la capilaridad, se han descrito en la dermatomiositis [22] y en la atrofia por deservación [21, 52].

El grado de severidad del daño muscular, se reflejó en la magnitud de los niveles séricos de las enzimas CK y AST, los cuales variaron desde niveles normales en la etapa subaguda y crónica (rangos CK: 76 UI/l-153UI/l; AST: 140UI/l-284UI/l) de la rabdomiólisis, hasta niveles máximos en etapa aguda (rangos CK: 172UI/l-10.000UI/l; AST: 332UI/l-15.000UI/l) Concomitantemente, las correlaciones de los niveles séricos de actividad de las enzimas CK, AST, ALT y LDH en el Grupo II, fueron positivas y significativas ($P < 0,001$), TABLA XI. Siendo igual a lo antes mencionado, constituye un apoyo a la investigación de otros autores [5, 8, 19, 39, 42, 43, 47, 48, 49, 53, 62, 65, 92, 93, 102, 104, 112, 120] quienes han sugerido que la elevación simultánea en los niveles séricos de estas enzimas marcadoras del daño muscular, pueden ser utilizados como índice de una necrosis muscular progresiva.

Es importante acotar sobre autores [112] que mencionan que los incrementos en los niveles de actividad de las enzimas CK y AST, no necesariamente se acompañan con los signos agudos de la rabdomiólisis (contractura y dolor muscular).

Por otra parte, los niveles séricos obtenidos de los animales controles Grupo I, son comparables con los observados por Yamaoka y col. [120] en CPSC en otras latitudes.

La AP, es una enzima que se encuentra presente en diferentes tejidos, siendo las de mayor concentración sérica las isoenzimas de origen óseo y hepático [79]. Es de gran peso molecular y se localiza en los microsomas intracelulares [79, 94]. El aumento de la AP en el equino adulto, se ha asociado con la AP hepática, probablemente como consecuencia del estrés en el organismo durante la actividad física, así como también por efecto de mayor producción de cortisol endógeno [49]. Este último evento, se ha utilizado como índice del nivel de esfuerzo físico [49]. En este contexto, los incrementos significativos ($P < 0,005$) observados en los niveles séricos de la enzima AP en el Grupo II de caballos, TABLA VIII, podrían tener alguna relación con el tipo de estrés físico al cual fueron sometidos estos animales.

La falta de correspondencia entre los niveles de actividad de AP y los de las enzimas CK y AST, observada en el Grupo II de caballos, TABLA XI, discrepa con las observaciones de Islas y col. [49] y de Rose y col. [93], realizadas en caballos sometidos a ejercicio de gran resistencia. Sin embargo, tal divergencia se podría explicar por el hecho de que las muestras de sangre obteni-



FIGURA 2. EN ESTA MICROGRAFÍA SE ILUSTRAN LA REACCIÓN HISTOQUÍMICA PARA LA NADH-diaforasa EN UNA SECCIÓN TRASVERSAL CORRESPONDIENTE A UN CABALLO DEL GRUPO II. NÓTESE LA PRESENCIA DE FIBRAS ANORMALMENTE PEQUEÑAS QUE REACCIONAN DE FORMA MEDIA A LA NADH-diaforasa. LA BARRA REPRESENTA 100m.

das de los caballos del Grupo II, provenía de ejemplares que se encontraban en distintas etapas del síndrome (etapa subaguda, aguda y crónica).

Los niveles séricos de K^+ ($3,57 \pm 0,045$ mEq/l) en los caballos del Grupo I, coinciden con los niveles de potasio normales en el CPSC, reportados por Arighi y col. [5] y por Koterba y Carlson [59]. Por otra parte, la presencia de niveles séricos normales de potasio en Grupo II ($3,57 \pm 0,045$ mEq/l) TABLA IX, coincide con los planteamientos de Tate y col. [106] quienes han señalado que el mantenimiento de niveles séricos normales de K^+ , en animales afectados de rabdomiólisis, probablemente obedece a la salida de K^+ sarcoplasmático. Así mismo estos autores han observado en el canino que el grado de severidad de las lesiones musculares, no presentó correlación con la disminución en los niveles séricos de K^+ . Estos resultados, disienten de la teoría defendida por Knochel y Schlein [56], los cuales sugirieron que el K^+ juega un papel muy importante en la etiopatogenia de la rabdomiólisis.

En cuanto a los incrementos significativos ($P < 0,025$) en los niveles séricos de Na^+ , TABLA IX así como en el aumento no significativo ($P < 0,05$) en la concentración de hemoglobina, TABLA XI, observadas en los caballos del Grupo II, podrían ser consecuencias de la sudoresis que presentaban algunos caballos, tal como lo planteó Hodgson [47].

La leucocitosis significativa ($P < 0,005$), evidenciada en los ejemplares del Grupo II, se correspondió, con la presencia de células inflamatorias en el músculo esquelético de estos animales, observadas por las técnicas de acridina de naranja, FIG. 3, y por la tinción de Hematoxilina-eosina, FIG. 4. Descripciones similares

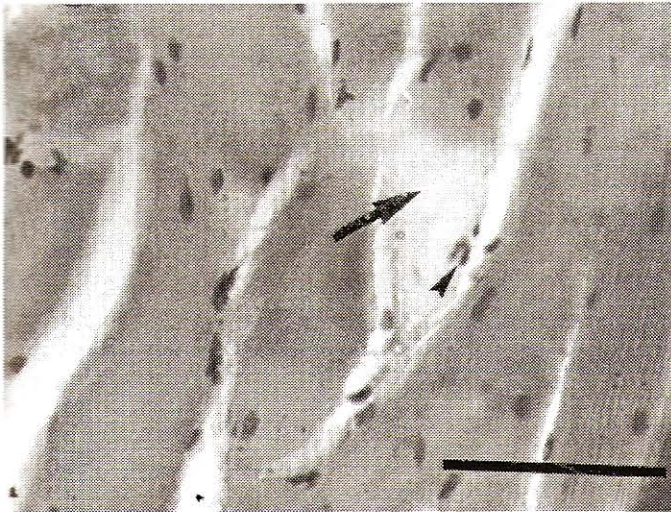


FIGURA 3. TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA, DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DEL *M.G.medius*, CORRESPONDIENTE A UN CPSC DEL GRUPO II. NÓTESE LA DEGENERACIÓN DE ZENKER (HIALINA O CEREAL), ASÍ COMO LA PRESENCIA DE INFILTRADOS CELULARES (CABEZA DE FLECHA). LA BARRA REPRESENTA 100m.

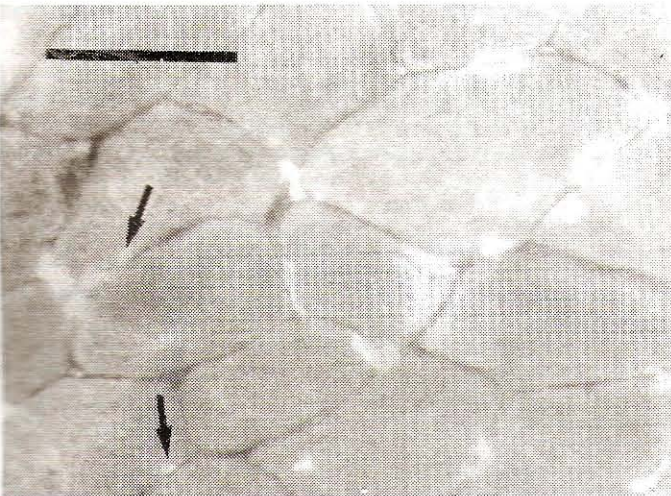


FIGURA 4. REACCIÓN CITOQUÍMICA DEL NARANJA DE ACRIDINA DE UNA SECCIÓN TRANSVERSAL DE UNA MUESTRA DE *M.G.medius*, DE UN EJEMPLAR DEL GRUPO II. NÓTESE LA PRESENCIA DE MACRÓFAGOS (CABEZAS DE FLECHA). LA BARRA REPRESENTA 100m.

a éstas, se han reportado en procesos inflamatorios del músculo como en la rabiomiólisis idiopática recurrente [96] y en la rabiomiólisis por ejercicio en el hombre [97].

CONCLUSIONES

Está muy bien documentado que el entrenamiento produce en el músculo esquelético (cuando está dirigido en forma adecuada), cambios en relación a los parámetros cociente de fibras IIA/IIB, capacidad oxidativa, áreas prome-

dios de los principales miofenotipos de fibras I, IIA y IIB, y capilaridad. Sin embargo, cuando el entrenamiento se efectúa de forma inapropiada (en términos de distancia, tiempo y velocidad), se produce a nivel de las fibras musculares, y de su irrigación un cuadro histopatológico descrito en la literatura como rabiomiólisis equina por ejercicio. En el presente estudio, se pudo observar en los CPSC afectados por el síndrome un daño preferencial en las fibras de contracción rápida Tipo II, disminución en la capilaridad, y en la capacidad oxidativa, incremento en la actividad sérica de las enzimas CK, AST y AP, leucitosis que se correspondió con la presencia de células inflamatorias en el músculo esquelético de estos animales. Estos hallazgos podrían ser de gran interés, no solo en el contexto de lo que debe ser un entrenamiento adecuado para el caballo como atleta, sino también indicativo de lo que las técnicas histopatológica, bioquímica y análisis hematológicos, son aplicables a la práctica del entrenamiento del PSC, podrían constituir un soporte para el desarrollo del hipismo científico venezolano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANDERSEN, P.; HERIKSON, J. Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: Adaptive response to exercise. **J. Physiol.**, 270: 677-690. 1977.
- [2] ANDREWS, F.M.; SPURGEON, T.L. Histochemical staining characteristic of normal horse skeletal muscle. **Am. J. Vet. Res.**, 47: 1843-1852. 1986.
- [3] ANDREWS, F. M.; SPURGEON, T.L. REED, S.M. Histochemical changes in skeletal muscles of four male horses with neuromuscular disease. **Am. J. Vet. Res.**, 47: 2078-2083. 1986.
- [4] ANTOCI, B.; PIZZOLITTO, S. Aspetti istoenzimatici ed ultra strutturali della miopatia mitocondriale (Mitocondriopatia). **Pathologica.**, 76: 655-658. 1984.
- [5] ARIGHI, M; BAIRD, J.D.; HULLAND, T.J. Equine exertional rhabdomyolysis. **Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.**, 6: 5726-5732. 1984.
- [6] AWAD, E.; CAMERO, B.; KOTITE, L. Chromatographic separation of haemoglobin and myoglobin on "sephadex" gel. **Nature (Lond.)**, 198: 1201-1202. 1963.
- [7] BARTSCH, R.C.; MC CONNEL, E.E.; INES, G.D.; SCHMIDT, J.M. A review of exertional rhabdomyolysis in wild and domestic animals and man. **Vet. Pathol.**, 14: 314-324. 1977.
- [8] BEECH, J. Chronic exertional rhabdomyolysis. **Vet. Clin North Am. Equine Pract.**, 13: 145-167. 1997.
- [9] BEECH, J.; FLETCHER, J.E.; LIZZO, F.; JOHNSTON, J. Effect of phenytoin on clinical signs and in vitro muscle twitch characteristics in horses with chronic intermittent rhabdomyolysis and myotonia. **Am. J. Vet. Res.**, 49: 2130-2133. 1988.

- [10] BERGSTRÖM, J. Muscle electrolytes in man: Determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens: a study in normal subjects, kidney patients, and patients with chronic diarrhoea. **Scanned. J. Cline. Lab. Invest.** 14 Suppl. 68: 1. 1962.
- [11] BLICOE, C; MARBEL, D. Storage stability of some bovine plasma enzymes. **Am J. Vet. Res.**, 46: 1242-2144. 1985.
- [12] BOULTON, F.E.; HUNTSMAN, R.G. The detection of myoglobin in urine and its distinction from normal and variant haemoglobins. **J. Clin. Pathol.**, 24: 816-821. 1971.
- [13] BRENDSTRUP, P. Late edema after muscular exercise. **Arch. Physiol. Med. Rehabil.**, 15: 464-466. 1962.
- [14] BRODAL, P.; INGJER, F.; HERMANSEN, L. Capillary supply of skeletal muscle fibres in untrained and endurance-trained men. **Am. J. Physiol.**, 242: 705-712. 1977.
- [15] BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fibre type: How many and what kind?. **Arch. Neurol.**, 23: 369-379. 1979.
- [16] BYLUND-FELLENIIUS, A.; IDSTRÖM, J.; HOLM, S. Muscle respiration during exercise. **Am Rev. Respir. Dis.**, 129 (Suppl): 510-512. 1984.
- [17] BYRD, S.K.; MCCUTCHEON, L.J.; HODGSON, D.R.; GOLLNICK, P.D. Altered sarcoplasmic reticulum function after high-intensity exercise. **J. Appl. Physiol.**, 67: 2072-2077. 1989.
- [18] CANÓNICO, P.G.; BIRD, J.W. The use of acridine orange as a lysosomal marker in rat skeletal muscle. **J. Cell. Biol.**, 43: 367-370. 1969.
- [19] CARDINET, G.H.; LITTEWELL, J.F.; FREEDLAND, R.A. Comparative investigations of serum creatine phosphokinase and glutamicoxalacetic transaminase activities in equine paralytic myoglobinuria. **Res. Vet. Sci.**, 8: 219-226. 1967.
- [20] CARLSTRÖM, B. Über die Etiologie und Pathogenese der Kreuzlahme des Pferdes. **Scand. Arch.**, 62: 1-62. 1932.
- [21] CARPENTER, S.; KARPATI, G. Necrosis of capillaries in denervation atrophy of human skeletal muscle. **Muscle Nerve**, 5: 250-254. 1982.
- [22] CARPENTER, S.; KARPATI, G.; ROTHMANN, S.; WATERS, G. The childhood type of dermatomyositis. **Neurology (Minneapolis)**, 26: 952-962. 1976.
- [23] CHENEY, J.A.; SHEN, C.K.; WHEAT, J.D. Relationships of racetrack surface to lameness in the Thoroughbred race horse. **Am. J. Vet. Res.**, 34: 1285-1289. 1973.
- [24] CHURCH, S. Hyperkalaemic periodic paralysis in Australian Quarter horses. **Aust. Vet. J.**, 72: 314-316. 1995.
- [25] CLARSSON, P.M.; TREMBLAY, I. Exercise-induced damage, repair, and adaptations in human. **J. Appl. Physiol.**, 65: 1-6. 1988.
- [26] CLIMIE, A.R.W. Muscle biopsy: technic and interpretation. **Am J. Clin. Pathol.**, 60: 753-770. 1973.
- [27] COHEN, N.D.; MUNDY, G.D.; PELOSO, J.G.; CAREY, V.J.; AMED, N.K. Results of physical inspection before races and race-related characteristics and their association with musculoskeletal injuries in Thoroughbreds during races. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, 215: 654-661. 1999.
- [28] COLLINS, J.D. Some haematological and biochemical values observed in the Irish Thoroughbred. **Irish Vet. J.**, 174-176. 1974.
- [29] COMI, G.; TESTA, D.; CORNELIO, F.; COMOLA, M.; CANALM, N. Potassium depletion myopathy: A clinical and morphological study of six cases. **Muscle Nerve**, 8: 17-21. 1985.
- [30] CULLEN, M.J.; MASTAGLIA, F.L. Pathological reactions of skeletal muscle. In: **Skeletal Muscle Pathology** 1^a edition. F.L. Mastaglia and J. Walton. Eds. Churchill Livingstone. Edinburgh London Melbourne and New York: 88-139. 1982.
- [31] DE LA CORTE, F.D.; VALBERG, S.J.; MACLEAY, J.M.; WILLIAMSON, S.E.; MICKELSON, J.R. Glucose uptake in horses with polysaccharide storage myopathy. **Am J. Vet. Res.**, 60: 458-462. 1999.
- [32] DUBOWITZ, V. Normal muscle, In: **Muscle Biopsy. A practical approach**, Bailliere Tindal. London, Philadelphia, Toronto, Sec. Edit. Chap. 3-4: 41-129. 1985.
- [33] ENGEL, W.K.; BETHESDA, M.I. Selective and nonselective susceptibility of muscle fiber type: A new approach to human neuromuscular diseases. **Arch. Neurol.**, 22: 97-117. 1970.
- [34] ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; VALBERG, S. Blood and muscle after racing ammonia concentration in horses during treadmill work and after racing. In **Equine Exercise Physiology 2**. J.R. Gillespie and N.E. Robinson. Eds. Davis California: 456-463. 1987.
- [35] EVANS, D.L.; WALSH, J.S. Effect of increasing the banking of a racetrack on the occurrence of injury and lameness in Standardbred horses. **Aust. Vet. J.**, 75: 751-752. 1997.
- [36] FRIDÉN, J.; SEGER, J.; EKBLÓM, B. Sublethal muscle fibre injuries after high-tension anaerobic exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 57: 360-368. 1988.
- [37] FRIDÉN, J.; SJÖSTRÖM, M.; EKBLÓM, B. A morphological study of delayed muscle soreness. **Experientia**, 37: 506-507. 1981.
- [38] FUJIMOTO, Y.; MADARAME, H.; YOSHIDA, H.; MORIGUCHI, R. Light and electron microscopic studies on

- muscular degeneration in foals. **Bull. Equine Res. Inst.**, 23: 14-27. 1986.
- [39] GABOW, P.A.; KAENY, W.D.; KELLEHER, S.P. The spectrum of rhabdomyolysis. **Medicine**, 61: 141-152. 1982.
- [40] GUNN, H.M. A perspective on athletic ability. **Irish Vet. J.**, 40: 85-86. 1986.
- [41] HAMMEL, E.P.; RAKER, C.W. Myopathies. In: **Equine Medicine and Surgery**. 2^a ed. E.J. Catcott and J.F. Smithcors. Eds. American Veterinary Publications, INC North West Street, Weaton, Illinois: 575-595. 1972.
- [42] HARRIS, P.A.; SNOW, D.H. Role of electrolyte imbalances in the pathophysiology of the rhabdomyolysis syndrome. In: **Equine Exercise Physiology 3**. S.G.B. Pearson, A. Lindholm and Jeffcott, L.B. Eds. Davis, C.A. ICEEP Publications: 435-442. 1991.
- [43] HARRIS, P. Differential diagnosis of an acute episode of a primary myopathy out pasture. **Equine Vet. Edu.**, 8:272-278. 1996.
- [44] HENCKEL, P. Training and growth induced changes in the middle gluteal muscle of young Standardbred trotters. **Equine Vet. J.**, 15: 134-140. 1983b.
- [45] HIKIDA, R.S.; STARON, R.S.; HAGERMAN, F.C.; SHERMAN, W.M.; COSTILL, D.L. Muscle necrosis with human marathon runners. **J. Neurol. Sci.**, 59: 185-203. 1983.
- [46] HODGSON, D.H. Exercise-associated myopathy: is calcium the culprit?. **Equine Vet. J.**, 25: 1-3. 1993.
- [47] HODGSON, D.H. Myopathies in the Athletic Horse. In: **Dynamics of Equine Athletic Performance**. Published by Veterinary Learning Systems, Co. Inc. Lawrenceville, New Jersey: 48-62. 1985.
- [48] HULLAND, T.J. Muscle and Tendons. In: **Pathology of Domestic Animals**. 3rd edition. J. Kennedy and A.C. Palmer. Eds. Academic Press New York: 139-199. 1985.
- [49] ISLAS, A.; PÉREZ, R.; ROJAS, R.; JARA, C.; MORA, G.; RECABARREN, S.; HETZ, E. Actividad sérica de creatina fosfoquinasa, aspartato aminotransferasa, deshidrogenasa láctica y fosfatasa alcalina en equinos mestizos de tiro sometidos a esfuerzo prolongado de tracción. **Arch. Med. Vet.**, 26: 53-59. 1992.
- [50] IWAMASA, T.; FUKUDA, S.; TOKUMITSU, S.; NINOMIYA, N.; MATSUDA, I.; OSAME. Myopathy due glycogen storage disease: Pathological and biochemical studies to glycogenosome formation. **Exp. Mol. Pathol.**, 38: 405-420. 1983.
- [51] JENNINGS, R.B.; BRAUM, J.H.; HERDSON, P.B. Fine structural changes in mitochondrial ischemic injury. **Arch. Pathol.**, 49: 135-143. 1965.
- [52] JERUSALEM, F. Circulatory disorders and pathology of intramuscular blood vessels in: **Skeletal muscle pathology**. F.L. Mastaglia and J. Walton. Eds. Churchill. London, Melbourne, New York: 537-560. 1982.
- [53] KAKULAS, b.a.; ADAMS, R.D. Special categories of primary muscle disease. In: **Diseases of muscle**. 4th edition. B.A. Kakulas and R.D. Adams. Eds. Harper and Row Publishers. Philadelphia: 311-668. 1985.
- [54] KANE, A.J.; STOVER, S.M.; GARDNER, I.A.; CASE, J.T.; JOHNSON, B.J.; READ, D.H.; ARDANS, A.A. Horseshoe characteristics as possible risk factors for fatal musculoskeletal injury of Thoroughbred racehorses. **Am. J. Vet. Res.**, 57: 1147-1151. 1996.
- [55] KEENAN, D.M. Changes of blood metabolites in horses after racing with particular reference to uric acid. **Aust. Vet. J.**, 55: 54-57. 1979.
- [56] KNOCHEL, J.P.; SCHLEIN, E.M. On mechanism of rhabdomyolysis in potassium depletion. **J. Clin. Invest.**, 51: 1750-1758. 1972.
- [57] KRINSKY, N.I. Mechanism of action of biological antioxidants. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 200: 248-254. 1992.
- [58] KORÉNYI-BOTH, A.; KORÉNYI-BOTH, I.; KAYES, B.C. Thyrotoxic myopathy: Phathomorphological observations of human material and experimental induced thyrotoxicosis in rats. **Acta Neuropathol (Berl.)**, 53: 237-248. 1981.
- [59] KOTERBA, A.; CARLSON, G.P. Acid-base and electrolyte alterations in horses with exertional rhabdomyolysis. **J. Am. Vet. Ass.**, 180: 303-306. 1982.
- [60] KROTKIEWSKI, M.; BRZEZINSKA, Z. Lipid peroxidation production after strenuous exercise and in relation to muscle morphology and capillarization. **Muscle Nerve**, 19: 1530-1537. 1996.
- [61] LABBE, R.; LINDSAY, T.; GATLEY, R.; ROMANSCHIN, A.; MICKLE, D.; WILSON, G.; HOULE, S.; WALKER, P. Quantitation of postischemic skeletal muscle necrosis: Histochemical and radioisotope techniques. **J. Surg. Res.**, 44: 45-53. 1988.
- [62] LAPRAS, M. Les myosites du cheval de sport. **Bull. Soc. Vet. Et Méd. (Lyon)**, 77: 259-262. 1975.
- [63] LIEBER, R.L.; FRIDÉN, J. Selective damage of fast glycolytic muscle fibres with eccentric contraction of the rabbit tibialis anterior. **Acta Physiol. Scand.**, 133: 587-588. 1988.
- [64] LINDHOM, A.; PIEHL, K. Fibre composition enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of Standardbred horses. **Acta Vet. Scand.**, 15: 287-309. 1974.
- [65] LINDHOLM, A.; JOHANSSON, H.; KJAERGAARD, P. Acute rhabdomyolysis (Tyging-up) in Standardbred

- horses. A morphological and biochemical study. *Acta Vet. Scand.*, 15: 287-309. 1974.
- [66] LÓFSTEDT, . White muscle disease of foals. **Vet. Cline North Am. Equine Pract.** 13: 169-185. 1997.
- [67] LÓPEZ, J.R.; LINARES, N.; CORDOVEZ, G.; TERZIC, A. Elevated myoplasmic calcium in exercise-induced rhabdomyolysis. **Pflügers Arch.**, 430: 293-295. 1995.
- [68] LÓPEZ-RIVERO, J.L.; MONTERDE, J.G.; MIRÓ, F.; DIZ, A.; MARTINEZ-GALISTEO, A. Biopsia muscular con aguja percutánea en el caballo: descripción y aplicaciones. **One 2ª época** 81: 26-28. 1989.
- [69] LOWRY, O.H.; PASSONEAU, J.V. A flexible system of enzymatic analysis. **Aca-demic Press. N.Y.**:1.1973.
- [70] MACLEAY, J.M.; VALBERG, S.J.; SORUM, S.A.; SORUM, M.D.; KASSUBE, T.; SANTSCHE, E.M.; MICKELSON, J.R.; GEYER, C.J. Heretability of recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbred racehorses. **Am. J. Vet. Res.**, 60: 250-256. 1999.
- [71] MANZ, H.J. Pathology of skeletal muscle: Principles of reaction patterns and histochemistry and experience with 159 biopsies: A review. **Virchows Arch.**, 386: 1-19. 1980.
- [72] MC CULLY, K.K. Exercise-induced injury to skeletal muscle. **Fed. Proc.**, 45: 2933-2936. 1986.
- [73] MC CURCHEON, L.J.; GEOR, R.J. Management of horses during training and competition in hot, humid conditions. **Comp. Cont. Edu. Pract. Vet.** 19: 109. 1997.
- [74] MC EWEN, S.A.; HULLAND, T.J. Histochemical and morphometric evaluation of skeletal muscle from horses with exertional rhabdomyolysis (Tying-up). **Vet. Pathol.**, 23: 411-417. 1986.
- [75] MCLEAN, J.G. Equine paralytic myoglobinuria (Azoturia): A review. **Aust. Vet.**, 49: 41-43. 1973.
- [76] MEGINNIS, P. Myositis (Tying-up) in race horses. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, 130: 237-239. 1957.
- [77] MEHTA, J.; CHOPRA, J.S.A.; MEHTA, S.; NAIN, C.K.; BHAGWAT, A.G.; DHAND, U.K.; RANA, S.V. Ultrastructure and activity of some enzymes of energy metabolism of skeletal muscle in experimental energy deficiency. **Ann. Nutr. Metabol.**, 31: 35-46. 1987.
- [78] MEIJER, A.E.F.H. Histochemical features of tubular aggregates in diseased human skeletal muscle fibres. **J. Neurol. Sci.**, 86: 73-82. 1988.
- [79] MERINO, V.; ISLAS, A.; JEREZ, D.; WILCKENS, R.; TORRES, V. Isoenzima de fosfatasa alcalina en equinos fina sangre de carreras. **Agro-Ciencia**, 11: 55-61. 1995.
- [80] MILLER, P.A.; LAWRENCE, L.M. The effect of submaximal treadmill training on heart rate, lactate and ammonia in Quarter horses. In: **Equine Exercise Physiology 2**. J.R. Gillespie and N.E. Robinson. Eds. ICEEP Publications, Davis CA: 476-484. 1987.
- [81] NAYLOR, J.M.; NICKEL, D.D.; TRIMINO, G.; CARD, C.; LIGHTFOOT, K.; ADAMS, G. Hyperlalaemic periodic paralysis in homozygous and heterozygous horses: a co-dominant genetic condition. **Equine Vet. J.**, 31: 153-159. 1999.
- [82] NIMMO, M.A.; SNOW, D.H. Time course of ultrastructural changes in skeletal muscle after two types of exercise. **J. Appl. Physiol.: Resp. Environ. Exercise Physiol.**, 52: 910-913. 1982.
- [83] NORMAN, G.R.; STRIENER, D.L. Regresión Simple y Correlación; Comparar dos grupos, El Test de la t. En: **Bioestadística**. McGraw-Hill. Interamericana, Madrid-España: 58-62; 100-128. 1996.
- [84] NOVIKOFF, A.B.; SHINE, E.; DRUCKER, J. Mitochondrial localisation of oxidation enzymes: Stain results with two tetrazolium salts. **J. Biophys. Biochem.**, 9: 47-61. 1961.
- [85] PADYKULA, H.A.; HERMAN, E. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. **J. Histochem. Cytochem.** 3: 170-195. 1955.
- [86] PARKHOUSE, W.S. Regulation of skeletal muscle myofibrillar protein degradation: Relationship to fatigue and exercise. **Int. J. Biochem.** 20: 769-775. 1988.
- [87] PERL, D.P.; LITTLE, B.W. Acridine Orange-Nucleic acid fluorescence. Its use in routine diagnostic muscles biopsies. **Arch. Neurol.**, 37: 641-644. 1988.
- [88] PLEASURE, D.E.; WALSCH, G.O.; ENGEL, W.K. Atrophy of skeletal muscle in-patients with Cussing's syndrome. **Arch. Neurol.**, 22: 118-126. 1970.
- [89] ROBB, E.J.; KROFELD, D.S. Dietary sodium bicarbonate as a treatment for exertional rhabdomyolysis in a horse. **J. Am. Vet. Ass.** 188: 602-607. 1986.
- [90] ROMANUL, F.C.A.; EDWARDS, L.H. Enzymatic changes in denervate muscle. **Arch. Neurol.**, 13: 263-273. 1965.
- [91] RONÉUS, B.; HAKKARAINEN, J. Vitamin E in skeletal muscle tissue and blood glutathione peroxidase activity from horses with azoturia-tying-up syndrome. **Acta Vet. Scand.**, 26: 425-427. 1985.
- [92] ROSE, P.L. Equine exertional rhabdomyolysis. A review. **Southwestern Vet.**, 38: 43-47. 1987.
- [93] ROSE, R.J.; ILKIW, J.E.; ARNOLD, K.S.; BACKHOUSE, J.W.; SAMPSON, D. Plasma biochemistry in the horse during 3-day event competition, **Equine Vet. J.**, 12: 132-136. 1980.
- [94] RUDOLPH, W.; NUÑEZ, I.; GODOY, A. Isoenzimas de fosfatasa alcalina en el suero de potrillos Fina Sangre de

- Carrera inglés obtenidas por electroforesis en gel de agarosa y neuraminidasa. **Arch. Med. Vet.**, 27: 27-34. 1996.
- [95] SALMINEN, A.; KIHSTRÖM, M. Lysosomal changes in mouse skeletal muscles during the repair of exercise injuries. **Muscle Nerve**, 8: 269-279. 1985.
- [96] SCARPELLI, D.G.; GREIDER, M.H.; FRAJOLA, W.J. Idiopathic recurrent rhabdomyolysis: A clinical, chemical and morphological study. **Am J. Med.**, 34: 426-435. 1963.
- [97] SCHRIER, R.W.; HENDERSSON, H.S.; TISHEIR, C.C.; TANNEN, R.L. Nephropathy associated with heat stress and exercise. **Ann. Inter. Med.**, 67: 356-376. 1967.
- [98] SHAH, A.J.; SHAGAL, V.; MUSCLIER, G.; SUBRAMANI, V.; SINGH, H. Morphogenesis of the mitochondrial alterations in muscle diseases. **J. Neurol. Sci.**, 1982.
- [99] SILVERMAN, H.; HIKIDA, R.S.; STARRON, R.S. Loss of thick filaments from a fast-twitch glycolytic muscle fibres of the pigeon pectoralis after chronic administration of Dantrolene Sodium. **Am. J. Anat.**, 155: 69-82. 1979.
- [100] SMITH, C.A.; WAGNER, P.C. Electrolyte imbalance and metabolic disturbances in endurance horses. **Comp. Cont. Deu. Pract. Vet.**, 7: 575-585. 1985.
- [101] SOZA, M.; KARPATI, S.; CARPENTER, S.; PRESCOTT, S. Calcium-induced damage of skeletal muscle fibres in markedly reduced by calcium channel blockers. **Acta Neuropathol. (Berl)**, 71: 70-75. 1986.
- [102] STASHAK, T.S. Diseases of Muscle. In: **Adams' Lameness in horses**. 4th edition, Lea and Febiger. Eds. Philadelphia: 324-338. 1987.
- [103] STEWART, G.A.; STEEL, J.D. Haematology of the fit racehorse. **J. S. Afr. Vet. Ass.**, 45: 287-291. 1974.
- [104] STUCK, E.K.; REINERTSON, E.I. Equine exertional myopathy. **Iowa State University Vet.**, 49: 56-60. 1987.
- [105] SUCRE, L.E.; FINOL, H.J.; PÉREZ, R.; PACHECO, I. Análisis ultraestructural del Músculo *Gluteus Medius* del caballo de tiro mestizo chileno, sometido a trabajo de labranza posterior a un período prolongado de inactividad. **Revista Científica FCV/LUZ**, 9: 205-214. 1999.
- [106] TATE, C.L.; BAGDON, W.J.; BOKELMAN, D.L. Morphologic abnormalities in potassium-deficient dogs. **Am. J. Pathol.**, 93: 103-116. 1987.
- [107] VALBERG, S.J.; MACLEAY, J.M.; BILLSTROM, J.A.; HOWER-MORITZ, M.A.; MICKELSON, J.R. Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with "tying-up" due to polysaccharide storage myopathy. **Equine Vet. J.**, 31: 43-47. 1999.
- [108] VALBERG, S.J.; TOWNSEND, D.; MIKELSON, J.R. Skeletal muscle glycolytic capacity and phosphofructokinase regulation in horses with polysaccharide storage myopathy. **Am. J. Vet. Res.**, 59: 782-785. 1998.
- [109] VALBERG, S.J.; MACLEAY, J.M.; MICKELSON, J.R. Exertional rhabdomyolysis and polysaccharide storage myopathy in horses. **Comp. Cont. Edu. Pract. Vet.**, 19: 1077-1085. 1997.
- [110] VALBERG, S.J. Muscular cause of exercise intolerance in horses. **Vet. Clin North Am. Equine Pract.**, 12: 495-514. 1996.
- [111] VALBERG, S.J.; GEYER, C.; SORUM, S.A.; CARDINET III, G.H. Familial basis of exertional rhabdomyolysis in Quarter horse-related breeds. **Am. J. Vet. Res.**, 37: 286-290. 1996.
- [112] VALBERG, S.; JÖNSSON, L.; LINDHOLM, A.; HOLMGREN, N. Muscle histopathology and plasma aspartate aminotransferase, creatine kinase and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. **Equine Vet. J.**, 25: 11-16. 1993.
- [113] VALENTINE, B.A.; DIVERS, T.J.; MURPHY, D.J.; TODHUNTER, P.G. Muscle biopsy diagnosis of equine motor neuron disease and equine polysaccharide storage myopathy. **Equine Vet. J.**, 10: 42-50. 1998.
- [114] VALENTINE, B.A.; CREDILLE, K.M.; LAVOIE, J.P.; FANTONE, S.; GUARD, C.; CUMMINGS, J.F.; COOPER, B.J. Severe polysaccharide storage myopathy in Belgian and Percheron draught horses. **Equine Vet. J.**, 29: 220-225. 1997.
- [115] VAN DEN HOVEN, R.; WENSING, T.; BREUKINK, H.J.; MIEJER, A.E.F.H. Enzyme histochemistry in exertional rhabdomyolysis. In **Equine Exercise Physiology 2**. J.R. Gillespie and N.E. Robinson. Eds. ICEEP Publications, Davis California: 796-810. 1987.
- [116] VELASCO, E.; FINOL, H.J. The effects of tenotomy on the ultrastructure of rat fast twitch muscle. **Acta Cient. Venez.**, 34: 124-131. 1983.
- [117] VIGNOS, P.J.; GREEN, R. Oxidative respiration of skeletal muscle in experimental corticosteroid myopathy. **J. Lab. Clin. Med.**, 81: 365-378. 1973.
- [118] WALDRON-MEASE, E.; RAKER, C.W.; HAMMEL, E.P. The muscular system. In: **Equine Medicine and Surgery**. 3rd edition. Vol. 2. R.A. Masman, E.S. McAllister and P.N. Pratt, Eds. Santa Barbara. American Veterinary Publications: 923-943. 1982.
- [119] WARHOL, M.J.; SIEGEL, A.J.; EVANS, W.J.; SILVERMAN, L.M. Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition. **Am. J. Pathol.**, 118: 331-339. 1985.

[120] YAMAOKA, S.; IKEDA, S.; WATANABE, H.; NAGASAWA, Y.; TARIZAWA, I.; HASEGAWA, M. Clinical and enzymological findings of Tying-up syndrome in Thoroughbred in Japan. **Exp. Rep. Equine Hlth. Lab.**, 15: 62-78. 1978.

[121] YOSHIDA, T.; UDO, M; CHIDA, M.; ICHIOKA, M.; MAKIGUCHI, K. Effect of hypoxia on arterial and venous blood levels of oxygen, carbon dioxide, hydrogen ions and lactate during incremental forearm exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 58: 772-777. 1989.