

ANORMALIDADES ULTRAESTRUCTURALES EN EL MÚSCULO GLÚTEO MEDIO DE UN CABALLO PURA SANGRE DE CARRERA, ASOCIADAS CON CORTICOTERAPIA PROLONGADA

Ultrastructural Abnormalities in Muscle Gluteus Medius of a Thoroughbred Race Horse Associated with Prolonged Glucocorticoid Therapy

Luis Eduardo Sucre Párraga¹ y Héctor José Finol²

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

RESUMEN

La administración crónica de corticosteroides naturales y sintéticos, conlleva a la atrofia y debilidad muscular, tanto en animales de experimentación como en el hombre. Estudios realizados para examinar este fenómeno, empleando técnicas como microscopía electrónica y bioquímica, han permitido identificar aquellos elementos del músculo más afectados por los glucocorticoides. Por ser la infiltración de glucocorticoides una práctica rutinaria dentro de la medicina veterinaria equina, se intentó con la presente investigación examinar desde el punto de vista ultraestructural, el efecto de la Dexametasona, sobre las fibras musculares del *M.G. medius* de una yegua de 3 años de edad, la cual fue sometida a un tratamiento prolongado (21 días) a dosis terapéuticas 5mg/100kg peso corporal de Devan[®], por vía intramuscular, en este músculo. Se tomaron biopsias musculares por punción percutánea del músculo glúteo medio izquierdo, y los especímenes se procesaron mediante la técnica estándar de microscopía electrónica de transmisión. Coincidiendo con reportes ultraestructurales previos relacionados con miopatía esteroidea, los hallazgos ultraestructurales coinciden con dos características histopatológicas diferentes: Miopatía vacuolar, y pérdida de masa muscular

Palabras clave: Caballos pura sangre, músculo esquelético, miopatía esteroidea, estudio ultraestructural.

ABSTRACT

Long term administration of natural or synthetic corticosteroids has been shown to induce muscular atrophy and weakness, in

both, experimental animals and man. Performed studies to examine this phenomenon have applied electron microscopy and biochemical techniques to identify those organelles of muscle that are more affected by glucocorticoids. Infiltration of glucocorticoids is a routine practice in equine veterinary medicine. For this reason, the purpose of this study was to examine Dexametasona effect on the fibres of *M.G. medius* of 3 years old mare, with prolonged (21 days) administration of therapeutic doses 5mg/100kg body weight, Devan[®], for intramuscular injection in this muscle. Needle biopsy technique was used to obtain muscle sample of the left middle gluteal muscle. Muscle samples were prepared with slides for transmission electron microscopy study. Coinciding with previous ultrastructural reports on steroid myopathy. Ultrastructural findings agreed two different histopathological features: Vacuolar myopathy, and loss of muscle mass.

Key words: Thoroughbred, skeletal muscle, steroid myopathy, ultrastructural study.

INTRODUCCIÓN

El uso de los glucocorticoides marcó un hito en la terapia antiinflamatoria, administrándose con éxito a pacientes por una variedad de condiciones. Sin embargo, hacia los años 50, autores como Kemmerlin [34] alertaron sobre algunas precauciones y contraindicaciones que se deberían tomar en consideración, con el uso prolongado de este esteroide adrenocortical. Dentro de los efectos colaterales más sobresalientes indicados por Kemmerlin [34] y Van Der KolK [71], son dignos de mencionar: la gluconeogénesis, a partir de la grasa y de las proteínas tisulares; la hiperglicemia; la glucosuria; la eosinopenia;

retención de sodio; edema; pérdidas de potasio, (debido a la poliurea) y la polidipsia.

Además de estos efectos secundarios, ya para 1932, Cushing [14] había observado que podría existir una asociación, entre los excesivos niveles plasmáticos de glucocorticoides con la debilidad y fácil fatigabilidad muscular, en pacientes con adenoma basofílicos del cuerpo de la pituitaria. Tales observaciones de Cushing, fueron corroboradas al año siguiente por Marburg [48], quien describió en pacientes con el síndrome de Cushing, debilidad de los músculos del cinturón pélvico. A partir de estos pioneros reportes, se ha descrito la miopatía degenerativa, producto del hiperadrenocorticismo espontáneo o iatrogénico en el humano [4, 7, 30, 33, 40, 42, 53, 57] y en el equino [47, 71].

La manifestación clínica de la debilidad muscular, además de ser una característica del síndrome de Cushing [4, 7, 30, 33, 40, 47, 53, 57, 71], también se ha observado en pacientes humanos que han recibido terapias prolongadas de glucocorticoides, por presentar cuadros clínicos de enfermedades autoinmunes, del tejido conjuntivo tales como: la artritis reumatoidea [5, 54, 59], la polimiositis [5], el lupus eritematoso sistémico (LES) [5]. Así mismo, se han observado trastornos musculares, en tratamientos para el asma [76]. Observaciones similares sobre el efecto de los glucocorticoides exógenos en el ámbito muscular, se han indicado en estudios experimentales en gatos [27, 58], en ratas [9, 17, 35, 36, 55, 56, 60, 61, 67, 69] y en conejos [2, 19, 32, 64, 66].

Varios autores [32, 33, 40, 68], han coincidido en señalar que la debilidad muscular, observada en los pacientes con altos niveles plasmáticos de glucocorticoides, debido al síndrome de Cushing, o bien por tratamientos prolongados con glucocorticoides, es atribuible a la potente acción catabólica ejercida por estos esteroides sobre las fibras musculares esqueléticas. Dicha actividad conduce a un aumento en la degradación de las proteínas musculares [17, 58, 69, 69]. Adicionalmente, la atrofia reportada en las fibras musculares, se han asociado con disminución en la síntesis de las proteínas contráctiles, debido posiblemente a deterioro en la formación de cadenas peptídicas [56].

Además de producir atrofia de las fibras musculares, los glucocorticoides afectan la función muscular por varios mecanismos, tales como: alteraciones en la función del retículo sarcoplasmático [64], en las propiedades de la membrana muscular [28, 35, 61], en la transmisión neuromuscular [78] y en las propiedades eléctricas de las unidades motoras en los músculos rápidos y lentos [58].

La miopatía esteroidea, se ha podido analizar empleando técnicas como la microscopía electrónica, bioquímica e histoquímica. Con esta última, se ha podido demostrar que la atrofia de las fibras musculares, por efecto de los glucocorticoides, es más pronunciada en las fibras de contracción fásico-rápidas o del tipo II [27, 53, 58, 66].

Desde el punto de vista ultraestructural, el cuadro histopatológico que presentan las fibras musculares esqueléticas por efecto de los glucocorticoides, se ha caracterizado por: pérdida de miofilamentos, disociación de la línea Z, presencia de mitocondrias hinchadas, pérdidas de algunas regiones mitocondriales, acumulo excesivo de partículas de glucógeno y de gotas lipídicas, cambios en el retículo sarcoplasmático, presencia frecuente de estructuras lisosomales (figuras mielínicas y gránulos de lipofucsina), engrosamiento de la membrana basal de los capilares intramusculares y eventualmente necrosis segmental [1, 2, 4, 17, 19, 32, 36, 55, 67].

Se han asociado los cambios a nivel mitocondrial, por efecto de los glucocorticoides, con la disminución en la capacidad oxidativa de las fibras musculares [19, 39, 55, 75].

Autores como Diamond y col. [15] y Jirmanová y col. [32], han indicado que la respuesta del músculo al efecto de los glucocorticoides, se acentúa en los animales en desarrollo, ya que las administraciones de los mismos durante el período postnatal, compromete seriamente tanto el crecimiento somático, como el muscular.

Debido muy probablemente a la propiedad que poseen los esteroides de estabilizar las membranas celulares [6], no se han observado alteraciones en los niveles séricos de las enzimas marcadoras del daño muscular, como la creatina quinasa (CK), en pacientes con enfermedad de Cushing [18, 33].

Los glucocorticoides en medicina veterinaria equina, han sido indicados en el tratamiento y prevención de la rabdomiólisis por ejercicio, ya que actúa como relajante muscular (retarda la liberación del calcio del retículo sarcoplasmático) [77]; aumenta la perfusión (ya que produce la relajación de los esfínteres capilares) y; estabiliza las membranas celulares [6].

Debido principalmente a que es una práctica común en nuestros hipódromos y haras, la infiltración frecuente por vía intramuscular e intraarticular de glucocorticoides, se intentó con la presente investigación, analizar desde el punto de vista ultraestructural, las posibles alteraciones en las fibras musculares esqueléticas del *M.G. medius* del Caballo Pura Sangre de Carrera, por efecto de la administración intramuscular prolongada de Dexametasona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente estudio, se tomaron biopsias musculares por punción percutánea al músculo glúteo medio izquierdo de dos (2) yeguas Pura Sangre de Carrera de 3 años de edad, que se encontraban para el momento de la toma de las muestras musculares en período de entrenamiento en el Hipódromo "La Rinconada", en la ciudad de Caracas, Venezuela. Una de las yeguas analizadas, presentaba de forma crónica, después de la ejecución de una sección rutinaria de ejercicios matutinos, trastornos en la locomoción (envaramiento) y dolores musculares (mialgia) en las regiones corres-

pondientes a la grupa izquierda y en el miembro pelviano izquierdo. Esta sintomatología, es característica de la rabdomiólisis crónica por ejercicio [6, 65]. Debido a los problemas musculares que presentaba esta yegua, se le indicó una terapia antiinflamatoria, a base de Devan® (Dexametasona), a una dosis terapéutica de 5mg/100kg. de peso corporal, por vía intramuscular, en el músculo glúteo medio izquierdo, cada 24 horas. La terapia aplicada al animal por un período de veintiún (21) días, le provocó una disminución marcada en el volumen de la región de la grupa izquierda, por lo que se recomendó realizarle un análisis ultraestructural.

La otra yegua analizada que sirvió de control, se encontraba en condiciones clínicamente sanas, y no presentaba los trastornos musculares señalados por efecto del ejercicio físico.

Biopsias musculares

Para la toma de los especímenes de biopsia muscular del *M. Gluteus medius* de los caballos de tiro, se siguieron las pautas descritas por Lindholm y Piehl [44], las cuales se describen a continuación:

La biopsia se obtuvo permaneciendo la yegua en estación sin tranquilización previa. Para ello, se tomaron referencias anatómicas concretas, realizándose la biopsia sobre el área que dista 3 cm dorsal al límite entre los tercios craneal y medio de la línea que une el centro de la espina ilíaca ventral con el punto más culminante de la porción caudal del trocánter mayor del fémur [46].

La zona seleccionada (un área de aproximadamente 5-10cm²), se rasuró y se le hizo antisepsia. A continuación, se inyectaron subcutáneamente 3 ml de clorhidrato de procaina (Novocaína, solución al 2%) con aguja recta de 0,8 mm x 25 mm a lo largo de la línea prevista la cual puede afectar a la piel y la fascia de revestimiento externo del músculo, pero no al tejido muscular subyacente, pues ello puede alterar las características de la muestra [46, 65]. Transcurridos entre 3 y 5 minutos de la infiltración anestésica, se procedió a la intervención propiamente dicha. Para ello, se incidió 5 mm la piel, tejido subcutáneo y fascia glútea con hojilla de bisturí N° 4. Seguidamente, la aguja de biopsia muscular diseñada por Bergström [8], se insertó en el espesor del músculo (aproximadamente 5 cm de profundidad) con dirección ventromedial y con la ventana de la aguja dirigida hacia arriba o hacia un lado. Para ello, se retiró parcialmente el cilindro interno cortante, al tiempo que la aguja, se comprimió suavemente contra la masa muscular mediante un movimiento de palanca, para favorecer así la entrada del tejido muscular a través de la ventana. En este momento, el cilindro interno cortante se introdujo decididamente produciéndose con este movimiento la sección de muestra muscular. Esta operación se repitió de 2 a 3 veces, antes de extraer en forma definitiva la aguja, a objeto de obtener una cantidad suficiente de tejido muscular (obteniéndose aproximadamente 50-200 mg de tejido). Por último, la aguja se extrajo con suavidad del músculo, y la muestra (ya con la agu-

ja fuera del músculo) se sacó del interior del cilindro interno cortante con la ayuda del estilete. Al extraer la aguja se humedeció la superficie de la piel con un algodón embebido en alcohol isopropílico, haciendo presión con los dedos índice y pulgar sobre el área, con el propósito de hacer hemostasis. La operación no requiere sutura cutánea y concluye con la disposición sobre la herida quirúrgica de sustancias cicatrizantes y antisépticas.

Ultraestructura

Luego de la toma de la biopsia muscular percutánea, las tiras de músculo se procesaron inmediatamente para su observación al microscopio electrónico de transmisión, siguiendo las pautas descritas por Finol [24] para la técnica de corte fino: Pre-fijación en glutaraldehído diluido en buffer fosfato (pH 7,4), post-fijación en OsO₄, disuelto en el mismo buffer, deshidratación en alcoholes crecientes, infiltración en óxido de propileno, inclusión en la resina LX-112, corte con cuchilla de diamante, tinción con citrato de plomo y acetato de uranilo y observación en un microscopio de transmisión marca Hitachi, modelo H-500, con un voltaje de aceleración de 100kV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ultraestructura del *M.G. medius*

El uso de criterios como el grosor y trazado de la línea Z, presencia de línea M, disposición de los filamentos finos alrededor de los gruesos a nivel de la banda A, desarrollo del sistema sacotubular, número de mitocondrias, y presencia de gotas lipídicas, han permitido diferenciar los principales miofenotipos de fibras musculares esqueléticas (Tipo I, IIA y IIB) [50]. Tomando en consideración tales criterios, se pudieron evidenciar en los especímenes de biopsia muscular obtenidas de las dos (2) yeguas analizadas, la presencia de tres (3) tipos básicos de fibras musculares esqueléticas (I, IIA y IIB) en el *M. G. medius* de estos animales.

Trabajos previos [27, 53, 58, 66] y el análisis ultraestructural del presente estudio, han coincidido en señalar que las fibras Tipo II, son las más afectadas por el efecto de los glucocorticoides. Con relación a esto, se describen las características normales de las fibras Tipo II, y los cambios ultraestructurales más sobresalientes en este tipo de fibra, evidenciadas en las muestras musculares tomadas de la yegua control y del ejemplar enfermo respectivamente.

Ultraestructura del músculo sano

Las fibras tipo IIB, se encontraron líneas Z delgadas. Además, a la mitad del sarcómero se evidenció claramente la línea M. Por su parte, el sistema sarcotubular se destacó por la complejidad de sus elementos, localizándose las tríadas a nivel de la unión de las bandas A e I y dispuestas perpendicularmente al eje longitudinal de las fibras. Se observó gran can-

tividad de partículas β de glucógeno en los espacios intermiofibrilares, y un escaso número de mitocondrias, FIG. 1.

Las fibras tipo IIA, presentaron líneas Z gruesas y de trazado algo irregular, FIGS. 2 y 3. Con relación al sistema sarcotubular, éste se caracterizó por la presencia de dos tríadas por sarcómero, FIG. 1. No obstante su desarrollo fue menor al observado en las fibras Tipo IIB. Cabe destacar que las fibras Tipo IIA mostraron un gran número de gotas lipídicas y mitocondrias, tanto en los espacios intermiofibrilares, FIGS. 2 y 3, como a nivel subsarcolémico, FIGS. 2 y 3, especialmente en aquellas zonas próximas a los vasos capilares, FIG. 3. Aun cuando esos organelos fueron electrón denso, pudieron distinguirse por sus crestas tubulares, FIG. 2 y lamelares, FIG. 3.

Además de lo indicado, se evidenciaron organelos relacionados a los lisosomas: gránulos de lipofucsina y figuras mielínicas, FIG. 2.

Los capilares intramusculares exhibieron una pared endotelial con numerosas vesículas pinocíticas y algunas prolongaciones hacia el lumen, FIG. 3.

Ultraestructura del músculo enfermo

El análisis ultraestructural de los especímenes de biopsia muscular, obtenidos del ejemplar sometido a una terapia prolongada con la Dexametasona, coincide con reportes previos, relacionados con los cambios ultraestructurales del músculo esquelético, en respuesta al efecto de los glucocorticoides endógenos (Síndrome de Cushing) y exógenos.

En el presente estudio, los cambios producidos por los glucocorticoides, exhiben la presencia de dos cuadros histopatológicos. Por una parte, la presencia de una miopatía vacuolar, caracterizada por formación de vacuolas a nivel subsarcolémico, FIG. 4, las cuales exhibieron un contenido traslucido, finamente granulado con restos de membranas de organelos subcelulares. El otro cuadro, está relacionado con alteraciones en el sistema contráctil, determinado por pérdida de miofilamentos, FIGS. 4, 5, 6 y 7, llegando incluso a la atrofia, FIG. 5. Así mismo, se observó un trazado zigzagüeante de la línea Z, FIG. 6 y 8.

La miopatía vacuolar, se ha asociado con el efecto de los glucocorticoides, sobre la musculatura esquelética [20]. Por esto la presencia de las vacuolas, se han reportado en pacientes con el síndrome de Cushing [4], o en los casos en donde se han utilizado los glucocorticoides, con fines clínicos [66] y/o experimentales [32].

Se hace necesario hacer la acotación que en semejanza a lo observado en la miopatía esteroidea, en la miopatía por depleción de potasio (parálisis periódica hipocalémica), se ha observado en casos clínicos de hipopotasemia [11] y condiciones experimentales, en donde se ha inducido pérdidas de potasio [13], una miopatía vacuolar, debido probablemente a una dilatación conspicua del retículo sarcoplasmático. Esta similitud entre ambas miopatías, también se encuentra en el hecho



FIGURA 1. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIB. LA LÍNEA Z (Z) ES FINA Y DE TRAZO RECTO. NÓTESE A LA MITAD DEL SARCÓMERO LA LÍNEA M (M). LAS TRÍADAS (tr), SE OBSERVAN A NIVEL DE LA UNIÓN DE LAS BANDAS A e I, DISPONIÉNDOSE DE FORMA PERPENDICULAR AL EJE LONGITUDINAL DE LA FIBRA. EN LOS ESPACIOS INTERMIOFIBRILARES SE ENCUENTRA UN GRAN NÚMERO DE PARTÍCULAS DE GLUCÓGENO (g). 25.312X. ESCALA: 1 μ m.

de que la debilidad muscular observada en pacientes con el síndrome de Cushing (hiperaldosteronismo primario), se debe en gran parte a la hipopotasemia, diagnosticada en estos pacientes [18, 33, 71]. Del mismo modo, la hipopotasemia, en ambas entidades (miopatía esteroidea y parálisis periódica hipocalémica), además de inducir debilidad y parálisis muscular, así como una severa polimiopatía, también es capaz de interferir con la síntesis de proteínas [16]. Sin embargo, la diferencia entre éstas miopatías, radica en el hecho de que la miopatía por deficiencia de potasio (parálisis periódica hipocalémica), se pueden incrementar los niveles séricos de las enzimas marcadoras del daño muscular CK, Aldolasa y SGOT, debido a las alteraciones funcionales y estructurales en la membrana celular que producen la deficiencia de potasio [72]. A pesar de



FIGURA 2. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA. NÓTESE A NIVEL INTERMIOFIBRILAR Y SUBSARCOLÉMICO, LA PRESENCIA DE MITOCONDRIAS (*) DE ASPECTO ELECTRÓN DENSO, CON CRESTAS DE FORMA TUBULARES. TAMBIÉN SE HACE EVIDENTE LA PRESENCIA DE LAS TRÍADAS (tr) A NIVEL DE LA UNIÓN DE LAS BANDAS A e I. 28.125X. ESCALA: 1 μ m.

esto último, los altos niveles séricos de la enzima CK por efecto de las pérdidas de potasio, no se desarrollan hasta que se alcancen concentraciones plasmáticas de potasio sumamente bajas (2,3 mEq/L), concentraciones éstas que coinciden con la necrosis muscular [16].

Las miopatías vacuolares, además de observarse en la parálisis periódica hipocalémica [20], también se han descrito en la miopatía tirotóxica [38], así como en la miopatía combinada de parálisis periódica hipocalémica tirotóxica [62]. Adicionalmente, la miopatía vacuolar se ha reportado en el lupus eritematoso sistémico [22] y en las miopatías inducidas por tratamientos profilácticos de cloroquina para prevenir la malaria [43] y en administraciones experimentales [63].

Las alteraciones en el sistema contráctil, pérdida de miofilamentos, han sido asociadas al balance negativo de nitróge-



FIGURA 3. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA. NÓTESE A NIVEL SUBSARCOLÉMICO LA PRESENCIA DE MITOCONDRIAS (*) DE ASPECTO ELECTRÓN DENSO, CON CRESTAS LAMELARES, ASÍ COMO LA PRESENCIA DE GRÁNULOS DE LIPOFUSCINA (lf) Y DE FIGURAS MIELÍNICAS (F). ADICIONALMENTE, ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA, EXHIBE UN CAPILAR INTRAMUSCULAR (C), CON VESÍCULAS PINOCÍTICAS EN EL ENDOTELIO, ASÍ COMO ALGUNAS PROLONGACIONES DEL ENDOTELIO CAPILAR HACIA EL LUMEN. 16.875X. ESCALA: 1 μ m.

no que se produce por efecto de los glucocorticoides [17]. En este sentido, se ha indicado que la administración de Dexametasona, aumenta la actividad de la enzima glutamina sintetasa, la cual es una enzima clave en la producción de glutamina, y responsable además de la movilización de los aminoácidos, a partir de las proteínas musculares [37,56]. Esto último, produce por una parte la disminución de la síntesis de proteínas contráctiles y por otro, al incremento en el catabolismo de éstas en el tejido muscular [56, 60], para el mantenimiento de los niveles sanguíneos de glucosa [68].

La pérdida de miofilamentos y el trazado zigzagueante de la línea Z, se han reportado en otras enfermedades endocrinas hipermetabólicas, como la miopatía tirotóxica [33, 38,



FIGURA 4. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA. SE PUEDE APRECIAR LA ULTRAESTRUCTURA DE UNA FIBRA MUSCULAR VACUOLADA. EL CONTENIDO DE LAS VACUOLAS, SE PRESENTA ELECTRÓNLUCIDO (*), FINAMENTE GRANULAR (cabeza de flecha), O CON REMANENTES DE MEMBRANAS DE ORGANELOS SUBCELULARES (flechas). 7.500X. ESCALA: 1 μ m.

40, 45], en donde ocurre un incremento en el catabolismo proteico, con liberación de amino ácidos, por efecto de las hormonas tiroideas y de la actividad lisosomal.

La pérdida de miofilamentos también se ha reportado en miopatías inducidas debido a: la deficiencia de potasio [13], administración de cloroquina [3, 41, 74], administración de monensina [12, 73], castración [31], desnervación [24] y a la rabiomíolisis por ejercicio [65], entre otras causas.

Tal pérdida condujo, por una parte, a la formación de diferentes grados de plegamientos por parte del sarcolema, FIGS. 5, 6 y 7, y por la otra, a la atrofia de las fibras musculares, caracterizándose por la existencia de amplios espacios con grandes cantidades de glucógeno, FIGS. 5 y 7. Reportes similares, se han descrito en diferentes miopatías de etiología diferentes [24].

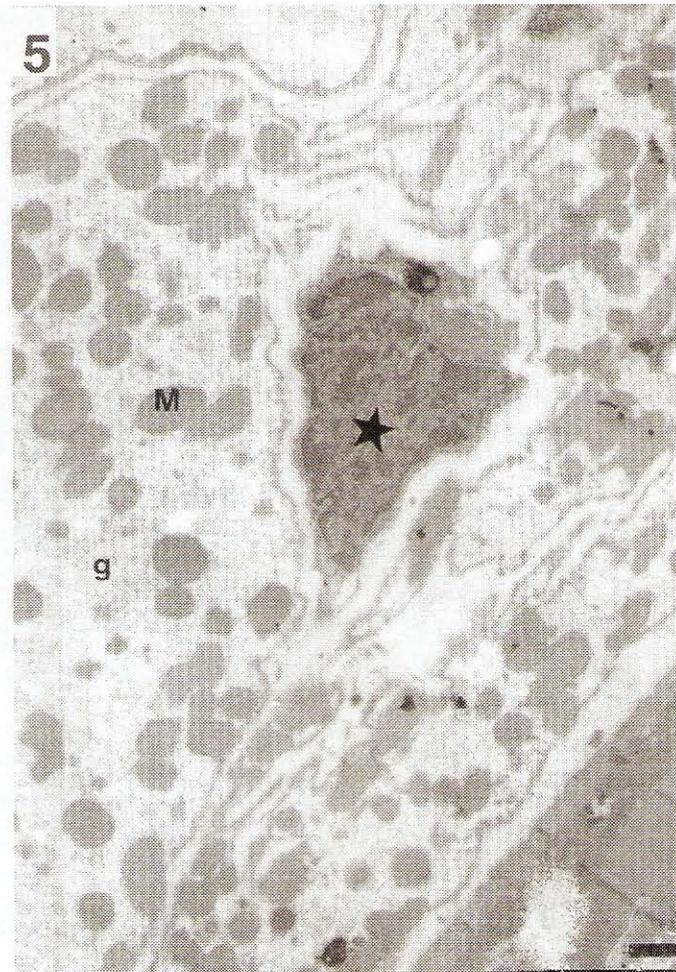


FIGURA 5. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA. ES EVIDENTE LA PÉRDIDA DE MATERIAL CONTRÁCTIL, Y LA PRESENCIA DE AMPLIOS ESPACIOS CON GRAN CANTIDAD DE GLUCÓGENO (g). LAS MITOCONDRIAS (M) PRESENTAN UN ASPECTO HOMOGÉNEAMENTE NORMAL. ADICIONALMENTE, ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA, EXHIBE UN MACRÓFAGO (*), EN EL ESPACIO INTERMIOFIBRILAR. 7.500X, ESCALA: 1 μ m.

Los acúmulos de glucógeno sarcolémicos observados en la presente investigación, FIGS. 5 y 7, así como en descripciones previas de miopatías esteroideas [1, 2, 32], han conllevado a la proposición de varias hipótesis que han tratado de elucidar este fenómeno. En este sentido, se ha indicado que tales acúmulos pudieran ser producto de la reducción marcada en la actividad de la enzima fosforilasa posterior a la inyección de glucocortisona, así como también por la acción de este esteroide sobre la actividad de la enzima glucógeno sintetasa, acción que favorece la transformación de la UDP-Glucosa a glucógeno [2]. Adicionalmente a esto, se ha indicado además que las pérdidas de potasio, son capaces de deprimir la utilización del glucógeno y la glucosa por parte del músculo esquelético [52].

En cuanto a las alteraciones a nivel mitocondrial, las mismas presentaron un aspecto homogéneo electrón denso,

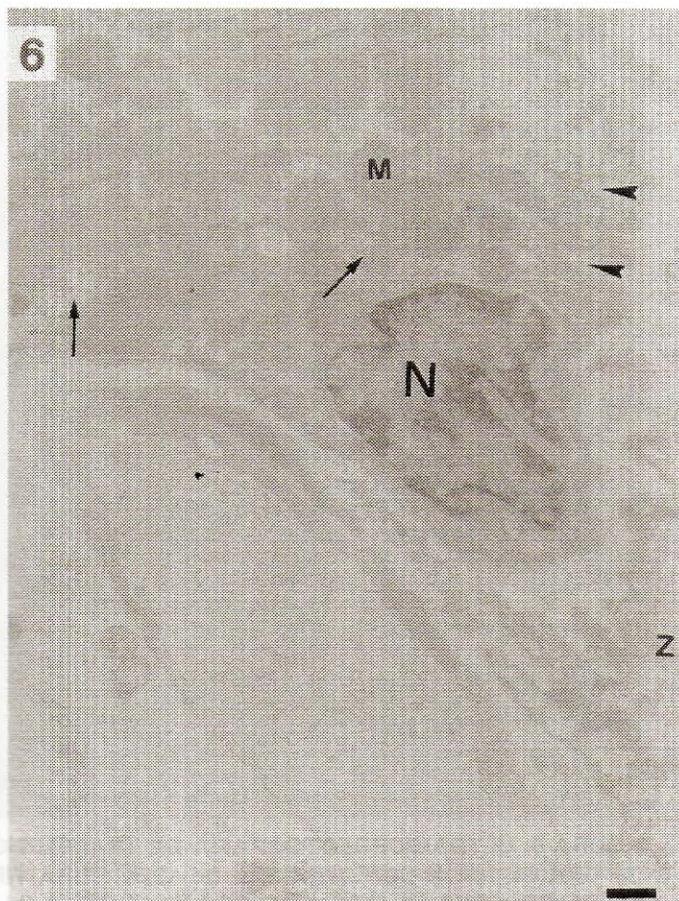


FIGURA 6. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA. SE PUEDE APRECIAR EN EL ESPACIO SUBSARCOLÉMICO UN NÚCLEO (N), MITOCONDRIAS CON UN ASPECTO HOMOGÉNEMENTE NORMAL (M), Y MITOCONDRIAS HINCHDAS (flechas). SE HACE EVIDENTE LOS PLEGAMIENTOS QUE PRESENTA EL SARCOLEMA (cabezas de flecha). CON Z, SE EXHIBE EL TRAZO ZIZAGÚEANTE QUE PRESENTA LA LÍNEA Z. 7.500X. ESCALA: 1 μ m.

FIGS. 4, 5, 6, 7, 8 y 9, aunque se apreciaron en algunos casos mitocondrias con una matriz electrón lucen, FIGS. 4, 6 y 8. Este aspecto electrón lucen (hinchado) de algunas mitocondrias, se ha asociado con alteraciones reversibles en el mecanismo del control osmótico de las mismas. Dichas alteraciones, conducen a la entrada de sodio y de agua al interior de las mitocondrias, y esto último, podría comprometer la habilidad de la fosforilación oxidativa, y producir daños en las membranas internas mitocondriales que se traducirían en una disminución en la producción de energía química en forma de Adenosin trifosfato (ATP) [12].

Alteraciones mitocondriales similares, se han descrito en la rbdomiólisis por ejercicio [65] y en la miopatía por deficiencia de vitamina E y de Selenio [26]. También se han observado, miopatías inducidas por monensina [12] y cloroquina [3].

En cuanto a los capilares intramusculares, los mismos presentaron prolongaciones hacia el lumen del capilar, FIGS. 7



FIGURA 7. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA. SE HACE EVIDENTE EN EL ESPACIO SUBSARCOLÉMICO, UN GLUCOGENOSOMA (*) DIGERIDO, ASÍ COMO MITOCONDRIAS CON UN ASPECTO HOMOGENIAMENTE NORMAL (M). NÓTESE LOS AMPLIOS ESPACIOS CON GRAN CANTIDAD DE GLUCÓGENO (g). CON FLECHAS, SE INDICAN PROLONGACIONES DEL ENDOTELIO CAPILAR HACIA EL LUMEN. 15.000X. ESCALA: 1 μ m.

y 8, así como un engrosamiento de la membrana basal, FIGS. 8 y 9. El engrosamiento de la membrana basal de los capilares intramusculares, así como las prolongaciones del endotelio hacia el lumen del capilar, constituyen alteraciones inespecíficas [24] descritas en desórdenes como en las miopatías tirotóxicas [23], en hipertensión por DOCA-sal [29] y en la miopatía asociada con la deficiencia de fósforo [51].

En cuanto a las estructuras lisosomales observadas con mayor frecuencia en la presente investigación, éstas consistieron en glucogenosomas, FIG. 7, gránulos de lipofucsina y vacuolas autofágicas, FIG. 9.

Con relación a los gránulos de lipofucsina, además de encontrarse presente en procesos miodegenerativos de etiología variada [24], son estructuras cuyo número aumenta con la edad de los individuos, tal como se ha reportado en el humano [25] y en Caballos Pura Sangre normales, descritos en trabajos previos [65]. Así mismo, la presencia de los gránulos de li-

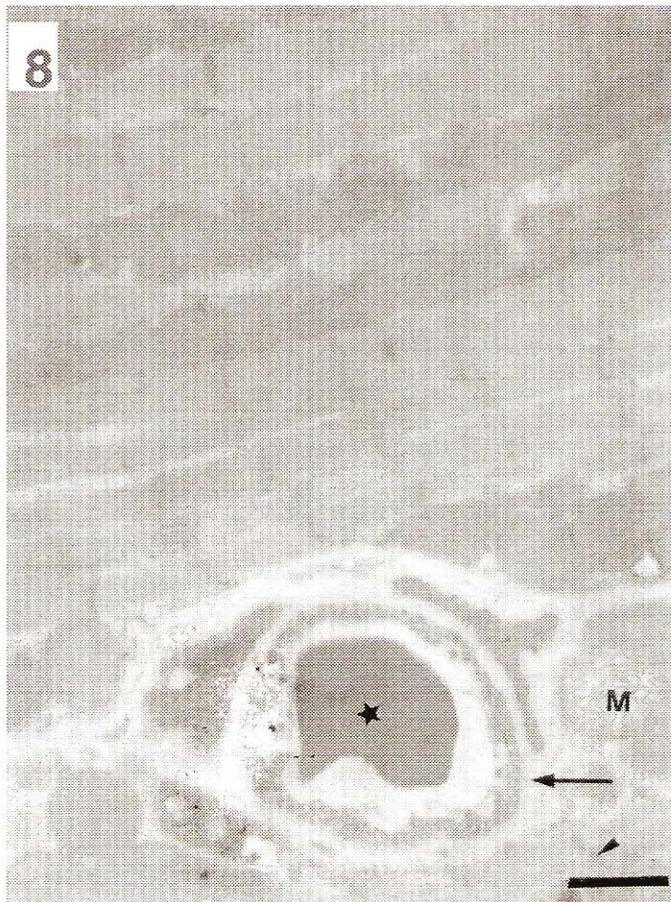


FIGURA 8. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA. SE OBSERVA UN CAPILAR INTERMIOFIBRILAR (*) CON UNA MEMBRANA BASAL ENGROSADA (flecha), UNA MITOCONDRIA (M) CON ASPECTO ELECTRÓN LUCIDO (HINCHADA). NÓTESE EL TRAZO IRREGULAR DE LA LÍNEA Z (cabeza de flecha). 15.000X. ESCALA: 1 μ m.

lipofucsina en las fibras musculares esqueléticas, han sido asociados con la actividad física [65], debido a que durante la ejecución de un ejercicio, se producen radicales libres [79]. Esto último podría explicar que, a pesar de que los animales analizados en el presente trabajo eran jóvenes (3 años), la actividad física desarrollada por los mismos, provocó la aparición de tales gránulos en sus fibras musculares.

Con respecto a los glucogenosomas, se ha relacionado su presencia con ciertas condiciones patológicas asociadas con problemas metabólicos, debido a la ausencia de ciertas enzimas glucogenolíticas [10]. Sin embargo, se ha señalado que los mismos también se localizan en fibras musculares de individuos normales tales como en el hombre [49], en los gatos [70] y en el Caballos Pura Sangre [65], por lo cual se hace necesario tener el debido cuidado al relacionarlos con una patología determinada.

El infiltrado celular, consistió en macrófagos, FIG. 5, y mastocitos FIG. 9. Tales infiltrados, han sido localizados en



FIGURA 9. ULTRAMICROFOTOGRAFÍA DE TRANSMISIÓN DE UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UNA FIBRA TIPO IIA. SE OBSERVA UN GRÁNULO DE LIPOFUCSINA (L), Y UNA VACUOLA AUTOFÁGICA (VA). LAS MITOCONDRIAS (M), PRESENTAN UN ASPECTO ELECTRÓN DENSO HOMOGÉNEO Y NORMAL. 14.468X. ESCALA: 1 μ m.

desórdenes musculares de diferentes etiologías como en los casos de: artritis reumatoidea [23] y lupus eritematoso sistémico (LES) [22]. La ausencia de linfocitos y polimorfonucleares, se debe probablemente a la depresión de las barreras inmunológicas, ya que la abundancia de tales infiltrados, se han observado en miopatías de origen bacteriano, viral y/o parasitario [24].

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los cambios ultraestructurales más sobresalientes observados en el músculo esquelético del ejemplar analizado, por efecto de una corticoterapia prolongada, coinciden con el cuadro histopatológico descrito en el músculo esquelético de pacientes que sufren del síndrome de Cushing, así como en aquellos que han recibido un tratamiento prolongado con glucocorticoides.

Los cambios ultraestructurales producidos por el efecto de una corticoterapia prolongada, y descritos en la presente investigación en las muestras de músculo esquelético de una yegua que padecía de rhabdomiólisis crónica por ejercicio, permiten sugerir que a pesar del comprobado efecto beneficioso

de los esteroides en la terapia antiinflamatoria en casos agudos, su uso en las terapias prolongadas se debe hacer con mucha precaución. En casos crónicos, Beech recomienda entre otras terapias, el uso de antiinflamatorios no esteroideos, tal como es el caso de la Fenilbutazona.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AFIFI, A. K.; BERGMAN, A.; HARVEY, J. C. Steroid myopathy: Clinical, histologic and cytologic observations. **Jhons Hopkins Med. J.**, 123: 158-174. 1968.
- [2] AFIFI, A.K.; BERGMAN, R.A. Steroid myopathy. A Study of the evolution of the muscle lesion in rabbits. **Jhons Hopkins Med. J.**, 124: 66-86. 1968.
- [3] AGUAYO, A.J.; HUDGSON, P. Observations on the short-term effects of chloroquine on skeletal muscle. An experimental study in the rabbit. **J. Neurol. Sci.**, 11: 301-325. 1970.
- [4] ATSUMI, T.; ISHIKAWA, S.; MIYATAKE, T.; YOSHIDA, M. Myopathy and primary aldosteronism: Electronmicroscopic study. **Neurol.**, 29: 1348-1353. 1979.
- [5] ASKARI, A.; VIGNOS, P. L.; MOSKOWITZ, R.W. Steroid myopathy in connective tissue disease. **Am. J. Med.**, 61: 485-492. 1976.
- [6] BEECH, J.B. Chronic exertional rhabdomyolysis, *Vet. Clin. North Am.* **Equine Pract.** 13: 145-167. 1997.
- [7] BEHREND, E.N.; KEMPPAINEN, R.J. Medical therapy of canine Cushing's syndrome. **Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.** 20: 679-697. 1998.
- [8] BERGSTRÖM, J. Muscle electrolytes in man: determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens: a study in normal subjects kidney patients and patients with chronic diarrhoea. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** 14 Suppl. 68: 1-110. 1962.
- [9] CAPACCIO, J.A.; KUROWISKI, T.T.; CZERWINSKI, S.M.; CHATTERTON, R.T.; HICKSON, R.C. Testosterone fails to prevent skeletal muscle atrophy from glucocorticoids. **J. Appl. Physiol.**, 63: 328-334. 1987.
- [10] CARPENTER, S.; KARPATI, G. Lysosomal storage in human skeletal muscle. **Human Pathol.**, 17: 683-703. 1986.
- [11] COMI, G.; TESTA, D.; CORNELIO, F.; COMOLA, M.; CANAL, N. Potassium depletion myopathy: A clinical and morphological study of six cases. **Muscle Nerve**, 8: 17-21. 1985.
- [12] CONFER, A.W.; REVAIS, D.U.; PANCIERA, R.J. Light and electron microscopic changes in cardiac and skeletal muscle of sheep with experimental monensine toxicosis. **Vet. Pathol.**, 20: 590-602. 1983.
- [13] CORBETT, A.J.; POLLOCK, M. Experimental potassium depletion myopathy. **J. Neurol. Sci.**, 49: 193-206. 1981.
- [14] CUSHING, H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations. **Bull Hopkins Hosp.**, 50: 137-195. 1932.
- [15] DIAMOND, I.G.; FRANKLIN, M.; MILFAY, D. The relationship of choline acetyltransferase activity at the neuromuscular junction to changes in muscle mass and function. **J. Physiol.**, 236: 247-257. 1974.
- [16] DOW, S.W.; LECOUTEUR, R.A.; FETTMAN, M.J.; SPURGEON, T.L. Potassium depletion in cats: Hypokalemic polymyopathy. **J.A.V.M.A.**, 191: 1563-1568. 1987.
- [17] DUBOIS, D. C.; ALMON, R.R. Disuse atrophy of skeletal muscle associated with an increase in number of glucocorticoid receptors. **Endocrinology**, 107: 1649-1651. 1980.
- [18] EATON, J.M. Miopatías: sus características y diagnóstico. **Tribuna Med.**: 9-12. 1987.
- [19] ELLIS, J.T. Necrosis and regeneration of skeletal muscles in cortisone treated rabbits. **Am. J. Pathol.**, 32: 993-1013. 1956.
- [20] ENGEL, A.G. Periodic paralysis. In: **Myology Basic and Clinical**, Engel, A.G. and Banker, B.Q. Eds. McGraw-Hill, New York, Vol. 2: 1843-1870. 1986.
- [21] FINOL, H.J.; MÜLLER, B.; MONTES DE OCA, I.; MÁRQUEZ, A. Ultrastructure of skeletal muscle in rheumatoid myositis. **J. Rheumatol.**, 15: 552-555. 1988. 1990.
- [22] FINOL, H.J.; MONTAGNANI, S.; MÁRQUEZ, A.; MONTES DE OCA, I.; MÜLLER, B. Ultrastructural pathology of skeletal muscle in systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, 17: 210-219. 1990.
- [23] FINOL, H.J.; MÜLLER, B.; TORRES, S.H.; DOMÍNGUEZ, J.; PERDOMO, P.; MONTES DE OCA, I. Ultrastructural abnormalities in muscular vessels of hyperthyroid patients. **Acta Neuropathol. (Berl.)**, 71: 64-69. 1986.
- [24] FINOL, H.J. Contribución al estudio de la ultraestructura del músculo esquelético enfermo. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. (Trabajo de Ascenso) 245pp. 1986.
- [25] FINOL, H.J.; MÁRQUEZ, A.; MÜLLER, B. Ultrastructure of lipofuscin granules in normal human skeletal muscles. **Acta Cient. Venez.**, 35: 414-418. 1984
- [26] 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.
- [27] GARDINER, P.F.; BOTTERMAN, B.R.; ELDERED, E.; SIMPSON, D.R.; EDGERTON, V.R. Metabolic and con-

- tractile changes in fast and slow muscles of the cat after glucocorticoid-induced atrophy. **Exp. Neurol.**, 62: 241-255. 1978.
- [28] GROSSIE, J.; ALBUQUERQUE, E.X. Extensor muscle responses to triamcinolone. **Exp. Neurol.**, 48:435-445. 1978.
- [29] HERNÁNDEZ, N.; TORRES, S.H.; FINOL, H.J.; SOSA, A.; CIERCO, M. Capillary and muscle fiber type changes in DOCA-salt hypertensive rats. **Anat. Rec.**, 246: 208-216. 1996.
- [30] HOSKINS, J.D.; NAFE, L.A.; CHO, D.Y. Myopathy associated with hyperadrenocorticism in a dog: a case report. **Vet. Med. Small Anim. Clin.**:760-766. 1982.
- [31] JIANG, B.; KLUEBER, K.M. Structural and functional analysis of murine skeletal muscle castration. **Muscle Nerve**, 12: 67-77. 1989.
- [32] JIRMANOVÁ, I.; SOUKUP, T.; ZELENÁ, J. The pathomorphology of developing skeletal muscles of rabbits treated with glucocorticoids. **Virchows Arch. (Cell Pathol.)** 38: 323-335. 1982.
- [33] KENDALL-TAYLOR, P.; TUMBULL, D.M. Endocrine myopathies. **Br. Med. J.**, 287: 705-708. 1983.
- [34] KEMMERLIN, R. Some precautions and contraindications of cortisone therapy. **Southeastern Vet.**, 9: 76-79. 1958.
- [35] KLEIN, L.E.; BARTOLOMEL, M.S.; LO, C.S. Corticosterone and triiodothyronine control of myocardial Na⁺-K⁺-ATPase activity in rats. **Am J. Physiol.**, 247: H570-H575. 1984.
- [36] KLOOSTERBOER, H.J.; STOKER-DEVRIES, S.A.; HULSTAERT, C.E.; HOMMES, F.A. Quantitative analysis of morphological changes in skeletal muscle of rat after hormone administration. **Biol. Neonate.**, 35: 106-112. 1979.
- [37] KONAGAYA, M.; KONAGAYA, Y.; TAKAYANAGI, T.; MAX, S.R. Inhibition of experimental steroid myopathy by blockade of glucocorticoid receptor a histological and biochemical study. **Exp. Pathol.**, 36: 20. 1989.
- [38] KORÉNYI-BOTH, A.; KORÉNYI-BOTH, I.; KAYES, B.C. Thyrotoxic myopathy. **Acta Neuropathol (Berl.)**, 53: 237-248. 1981.
- [39] KOSKI, C.; RIFENBERICK, D.; MAX, S. Oxidative metabolism of skeletal muscle in steroid atrophy. **Arch. Neurol.**, 31: 407-410. 1974.
- [40] KRUSE, K. Myopathien bei endokrinen Störungen. **Monatsschrift Kinderheilkd**, 132: 581-586. 1984.
- [41] KUMAMOTO, T.; UEYAMA, H.; WATANABE, S.; MURAKAMI, T.; ARAKI, S. Effect of denervation on overdevelopment of chloroquine-induced autophagic vacuoles in skeletal muscles. **Muscle Nerve**, 16: 819-826. 1993.
- [42] LECOUTEUR, R.A.; DOW, S.W.; SISSON, A.F. Metabolic and endocrine myopathies of dogs and cats. **Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)**, 4: 161-167. 1989.
- [43] LHERMITE, F.; MARTEAU, R.; CHEDRU, F.; MALLER-COURT, J.; ESTRADE, G.; GODET-GUILLAIN, J.; CHEVALLAY, M. Neuromyopathie á la chloroquine. Un cas au cours de traitement prophylactique antipaludique. **Now Presse Med.**, 6: 3205-3207. 1977.
- [44] LINDHOLM, A.; PIEHL, K. Fibre composition, enzyme activity and concentration of metabolites and electrolytes in muscles of Standardbred horses. **Acta Vet. Scand.**, 15: 287-309. 1974.
- [45] LLORETA, J.; ROQUER, J.; COROMINAS, J.M. Hypothyroid myopathy with mitochondrial paracrystalline rectangular inclusions. **Ultrastructural Pathol.**, 20: 61-65. 1996.
- [46] LÓPEZ-RIVERO, J.L.; MONTERDE, J.G.; MIRÓ, F.; DIZ, A.; MARTÍNÉZ-GALISTEO, A. Biopsia muscular con aguja percutánea en el caballo: descripción y aplicaciones. **One 2ª época** 81: 26-28. 1989.
- [47] LOVE, S. Equine Cushing's disease. **Br. Vet. J.**, 149: 139-143. 1993.
- [48] MABURG, O. Über das basophile adenom der hypophyse, die zerebrale fettsucht und die pseudohypertrophie der muskeln. **Arb. Neurol. Inst. Wien. Univ.**, 35: 143. 1933.
- [49] MÁRQUEZ, A.; FINOL, H.J. Glycogenosomes in fibres of human normal skeletal muscles. **Acta Neuropathol.** 43: 347-350. 1984.
- [50] MÁRQUEZ, A.; FINOL, H.J. Ultrastructural fiber typing of human abdominal muscles obliquus internus and externus. **Acta Cient. Venez.**, 41: 40-42. 1990.
- [51] MEDINA-LÓPEZ, N.; FINOL, H.J.; MARÍN, C. Patología ultraestructural del músculo esquelético en el síndrome parapléjico bovino. **Acta Cient. Venez.**, 45: 120-126. 1994.
- [52] OLERUD, J.E.; PRYOR, J.R.; EASON, R.L.; CAROLL, H.W. The role of potassium ion in muscle glycogenolysis and glycolysis. **Proceedings Soc. Exp. Biol. Med.**, 150: 677-680. 1975.
- [53] PLEASURE, D. E.; WALSH, G.O.; ENGEL, W.K.; BETHESDA, M.D. Atrophy of skeletal muscle in patients with Cushing's syndrome. **Arch. Neurol.**, 22: 118-125. 1970.
- [54] PERKOFF, G.T.; SILBER, R.; TYLER, F.H.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. Studies in disorders

- of muscle. XII Myopathy due to the administration of therapeutic amounts of 17-Hydroxycorticosteroids. **Am. J. Med.**, 26: 891-898. 1959.
- [55] PETER, J.B.; VERHAAG, D.A.; WORSFOLD, M. Studies of steroid myopathy: Examination of the possible effects of triamcinolone on mitochondria and sarcotubular vesicles of rat skeletal muscle. **Biochem. Pharmacol.**, 19: 1627-1636. 1970.
- [56] RANNELS, S.R.; JEFFERSON, L.S. Effects of glucocorticoids on muscle protein turnover in perfused rat hemi-corpus, **Am. J. Physiol.**, 238: E564-572. 1980.
- [57] ROARTY, G. Cushing's syndrome in the horse; A review. **Irish Vet. J.**, 43: 118-120. 1990.
- [58] ROBINSON, A.J.; CLAMANN, H.P. Effects of glucocorticoids on motor units in cat hindlimb muscles. **Muscle Nerve**, 11: 703-713. 1988.
- [59] ROTHSTEIN, J.M.; DELITTO, A.; SINACORE, D.R.; STEPHEN, J.R. Muscle function in rheumatic disease patients treated with corticoids. **Muscle Nerve**, 6: 128-135. 1983.
- [60] ROULEAU, G.; KARPATI, G.; CARPENTER, S.; SOZA, M., Prescott, S. and Holland, P. Glucocorticoid excess induces preferential depletion of myosin in denervated skeletal muscle fibres. **Muscle Nerve**, 10: 428-438. 1987.
- [61] RUFF, R.I.; STUHMER, W.; ALMERS, W. Effect of glucocorticoid treatment on excitability of rat skeletal muscle. **Pflügers Arch.**, 395: 132-137. 1982.
- [62] SCHUTTA, H.S.; ARMITAGE, J.L. Thyroxic hypokalemic periodic paralysis. A fine structure study. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 28: 321-336. 1969.
- [63] SGHIRLANZONI, A.; MANTEGAZZA, R.; MORA, M.; PAREYSON, D.; CORNELIO, F. Chloroquine myopathy and myasthenia-like syndrome. **Muscle Nerve**, 11: 114-119. 1988.
- [64] SHOJI, S.; TAKAGI, A.; SUGITA, H.; TOYOKURA, Y. Dysfunction of sarcoplasmic reticulum in rabbit and human steroid myopathy. **Exp. Neurol.**, 51: 304-309. 1976.
- [65] 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 laboranza posterior a un período prolongado de inactividad. **Revista Científica, FCV-LUZ**, IX: (4)205-214. 1999.
- [66] SMITH, B. Histological and histochemical changes in the muscles of rabbits given the corticosteroid triamcinolone. **Neurology (Minneapolis)**, 14: 857-863. 1964.
- [67] TICE, L.W.; ENGEL, A.G. The effects of glucocorticoids on red and white muscles in the rat. **Am. J. Pathol.**, 50: 311-333. 1967.
- [68] TISCHLER, M.E. Hormonal regulation of protein degradation in skeletal and cardiac muscle. **Life Sci.**, 28: 2569-2576. 1981.
- [69] TOMAS, F.M.; MUNRO, H.N.; YOUNG V.R. Effect of glucocorticoid administration on the rate muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N7 methylhistidine. **Biochem J.**, 178: 139-146. 1979.
- [70] TORRES, S.; MÁRQUEZ, A.; FINOL, H.J.; ROSA, F. Ultrastructural aspects of fast and slow muscles of trained and rest cats. **Acta Cient. Venez.**, 32: 88-89.
- [71] VAN DER KOLK, J. H. Equine Cushing's disease. **Equine Vet. J.**, 9: 209-214. 1997.
- [72] VAN HORN, G.; DRORI, J.B.; SCHWARTZ, F.D. Hypokalemic myopathy and elevation of serum enzymes. **Arch. Neurol.**, 22: 335-341. 1970.
- [73] VAN VLEET, J.F.; FERRANS, V.J. Ultrastructural alterations in skeletal muscle of pig with acute monensin myotoxicosis. **Am. J. Pathol.**, 114: 461-471. 1984.
- [74] VELASCO, E.; FINOL, H.J.; MÁRQUEZ, A. Toxic and neurogenic factors in chloroquine myopathy fibre selectivity. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, 27: 451-457. 1995.
- [75] VIGNOS, P.; GREEN, R. Oxidation respiration of skeletal muscle in experimental corticosteroid myopathy. **J. Lab. Clin. Med.**, 81: 365-379. 1973.
- [76] WILLIAMS T.J.; O'HEHIR, R.E.; CZARNY, D.; HORNE, M.; BOWES, G. Acute myopathy in severe acute asthma treated with intravenously administered corticosteroids. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 137: 460-463. 1988.
- [77] WALDRON-MEASE, E.; RAKER, C.W.; HAMMEL, E.P. The muscular system. In: **Equine Medicine and Surgery**. Vol. 2. 3th ed. Masmann, R.A., McAlliter, E.S. and Pratt, P.N. Eds. Santa Barbara: American Veterinary Publications: 938-942. 1982.
- [78] WILSON, R.W.; WARD, M.D.; JOHNS, T.R. Corticosteroids: a direct effect at the neuromuscular junction. **Neurology**, 24: 1091-1095. 1974.
- [79] YING, D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid and age pigment-like fluorophores. **Free Radical Biol. Med.** 21: 871-888. 1996.