

ASPECTOS ULTRAESTRUCTURALES DEL EFECTO DE LA L-carnitina SOBRE EL MÚSCULO *GLUTEUS medius* DEL CABALLO PURA SANGRE DE CARRERA (CPSC) SOMETIDO A EJERCICIO DE ALTA INTENSIDAD

Ultra-structural Aspect of the Effect of L-carnitine on the *Gluteus medius* Muscle in Thoroughbred Racehorses Subjected to a High Intensity Exercise

Marisol De Vera¹ y Luis Eduardo Sucre²

¹Servicios Veterinarios, Hipódromo Nacional de Valencia, Instituto Nacional de Hipódromos. Valencia, estado Carabobo.

²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563. Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela.

RESUMEN

Para la realización de este trabajo se evaluaron muestras de músculo *Gluteus medius* de Caballos Pura Sangre de Carrera (CPSC), obtenidas mediante biopsia por punción percutánea. Las unidades experimentales fueron divididas en cuatro grupos representados por: Grupo O (Go), animales inactivos; Grupo 1 (G1), animales controles sin L-carnitina exógena; Grupo 2 (G2), animales con 3 g de L-carnitina administrada intravenosa (IV); Grupo 3 (G3), animales con 6 g de L-carnitina administrada IV. Cada grupo estuvo conformado por cinco (5) animales, machos y de edades comprendidas entre 3 a 4 años. Los especímenes de biopsias musculares obtenidos, se procesaron por técnicas convencionales de microscopía electrónica de transmisión. Los resultados ultraestructurales revelaron que en el Grupo G1 (como producto de la ejecución de un ejercicio de alta intensidad), se observaron procesos miodegenerativos subletales en las fibras musculares representados por: pérdida de material contráctil con incremento de los espacios intermiofibrilares, trazos irregulares de la línea Z, plegamiento de sarcolema, presencia de mitocondrias con aspecto electrón lucen (hinchadas), en algunos casos existencia de gránulos intramitocondriales, así como presencia de gránulos de lipofucsina. En los Grupos G2 y G3, se evidenció un efecto protector de la L-carnitina sobre el músculo *Gluteus medius*, con características dosis dependiente, presentando el Grupo G2 sólo una leve pérdida de material contráctil, con edema de las cisternas terminales pero aspecto normal de las sarcomeras; mientras que en el Grupo G3 se observó fibras musculares de aspecto normal, con algunas mitocondrias aisladas electrón lucen (hinchadas). La presencia de gránulos de lipofucsina no fue elemento

encontrado en los grupos tratados (G2 y G3). Los hallazgos presentes en este estudio sugieren un posible efecto protector de la L-carnitina sobre el músculo locomotor *Gluteus medius* del CPSC, cuando esta es administrada antes de un ejercicio físico de alta intensidad.

Palabras clave: Músculo *Gluteus medius*, L-carnitina, ultraestructura.

ABSTRACT

In order to carry out this research samples of the *Gluteus medius* muscle from Thoroughbred racehorse, obtained by means of percutaneous biopsy, were evaluated. The experimental units were divided in four groups, represented by: Group 0 (Go), inactive animals; Group 1 (G1), control animals, with no exogenous L-carnitine; Group 2 (G2), animals on 3 g. of L-carnitine, administered intravenously; Group 3 (G3), animals on 6 g. of L-carnitine, administered intravenously. Each group consisted of five (5) male animals, ranging between 3 and 4 years of age. The muscle biopsy samples were processed by conventional techniques of electron microscopy transmission. The ultrastructural results showed that in Group 1 sub-lethal myodegenerative processes in the muscular fibers were observed, which were represented by: loss of contractile material and an increase of inter-myofibrillar spaces, irregular outlines of the Z line, sarcolemma folding, presence of mitochondria with electron lucen (swollen) aspects and in some cases the existence of intra-mitochondrial granules, as well as the presence of lipofucsin granules. In groups G2 and G3, a dose-dependent protector effect of L-carnitine on the *Gluteus medius* muscle was evident, Group G2 only showed a slight loss of contractile material, with edema of the terminal cisterns, however aspect of

the sarcomers was normal; whereas in Group G3 muscular fibers of normal aspect were seen, with some isolated electron lucen (swollen) mitochondrias. The presence of lipofuscine granules was not an element found in the treated Groups (G2 and G3). The findings presented in this study suggest a possible protector effect of L-carnitine over the locomotor muscle Gluteus medius of thoroughbred racehorses when it is given prior to high intensity physical performance.

Key words: *Gluteus medius* muscle, L-carnitine, ultra-structure.

INTRODUCCIÓN

Los estudios bioquímicos pioneros de Fritz [21], pudieron demostrar que la L-carnitina (3-hidroxi-4 ácido butírico trimetilamonio) estimula la -oxidación de los ácidos grasos, a través de la incorporación de los mismos al interior de la matriz mitocondrial. Adicionalmente la L-carnitina se ha asociado con la incorporación de lípidos estructurales, lo cual conduce a la estabilidad de las membranas biológicas (celular y subcelulares) [24]. Por otra parte el papel metabólico de la L-carnitina se ha relacionado con la regulación del cociente acetilCoA/CoA por el exceso de producción de acetilCoA en el músculo (efecto buffer) [17]. Basados en este último concepto, Brass y Hiatt [6] han podido señalar que la activación del papel homeostático de la L-carnitina en el músculo esquelético durante la ejecución de un ejercicio físico, está en íntima relación con la intensidad del trabajo realizado. Este rol de la L-carnitina (tanto la exógena como la sintetizada *de novo* en el hígado y riñón) durante el ejercicio, es fundamental para cubrir y suministrar los requerimientos energéticos del músculo esquelético exigidos durante la actividad física [23]. En este mismo contexto, varios autores (Holloszy y Booth [28]; Hodgson [26]; Carretelli y Marconi [7] han coincidido en indicar que la actuación metabólica de la L-carnitina, se puede resumir y puntualizar en tres aspectos básicos, que son: 1° favorece el transporte de cadenas largas de ácidos grasos dentro de la matriz mitocondrial (esta contribución indudablemente, se ve aumentada durante el ejercicio, debido al incremento fisiológico del flujo sanguíneo hacia el músculo, trayendo como consecuencia, un mayor aporte de oxígeno y nutrientes (glucosa y ácidos grasos) a este tejido). 2° Colabora con la adición de las reservas de acetato activo, en forma de acetil carnitina (con este evento bioquímico, se canaliza el exceso de piruvato hacia un uso más provechoso que indudablemente redundará en el incremento del umbral anaeróbico). 3° La descarboxilación del piruvato, contribuye al mantenimiento de las concentraciones de CoA, cuando la velocidad de formación de acetil CoA, supera a la producción de metabolitos finales como el oxalacetato. Los tres mecanismos indicados, permiten un verdadero equilibrio entre las fracciones libres y acetiladas de L-carnitina. Este equilibrio, representa el factor limitante para el suministro de energía al músculo, ya que la forma de carnitina libre, representa la fracción metabólicamente activa. Con relación a esto

último, Brass y Hiatt [6] han señalado que en reposo las concentraciones de carnitina total en el tejido muscular, se encuentran distribuidas en un 80% como carnitina libre, 15% como cadenas cortas de acilcarnitina y un 5% como cadenas largas de acilcarnitina, y que después de un ejercicio intenso, estos porcentajes pueden sufrir una redistribución (que refleja el estado metabólico del músculo), de tal manera que 20 a 50%, se encuentra como carnitina libre y un 45 a 75% en forma de cadenas cortas de acilcarnitina.

La deficiencia de L-carnitina, se ha asociado en el hombre con ciertos procesos miod degenerativos (en su mayoría de origen genético) que se conocen en la literatura como miopatías mitocondriales [31,46]. Tales deficiencias son capaces de disminuir la estabilidad de las membranas celulares y subcelulares [24], además de comprometer el transporte de ácidos grasos a través de la membrana interna mitocondrial, conduciendo inexorablemente a un trastorno en la producción del ATP [31].

Khan y Bramji [34] y Bartholmey y Sherman [1] han señalado que la deficiencia de la L-carnitina, puede ser producida por dos mecanismos: 1° Debido a un suministro insuficiente de la L-carnitina en la dieta, y 2° Por la ausencia en el alimento de algunos de sus precursores (el ácido ascórbico, la piridoxina, la niacina, la metionina, la lisina y el hierro). Es interesante señalar que el contenido de L-carnitina en los alimentos de origen vegetal es muy deficiente, si se compara con las concentraciones evidenciadas en los alimentos de origen animal [43]. En este orden de ideas, en el equino se podrían asociar dos variables que eventualmente conseguirían desencadenar un cuadro histopatológico a nivel muscular por deficiencia de L-carnitina. Una de estas variables, lo constituye el hecho de que el caballo es un animal herbívoro, y la otra (evidenciada en el humano), podría asociarse según Lennon y col. [35], a la disminución del pool de carnitina libre en el músculo, inducida por las altas demandas energéticas que se generan a nivel muscular durante la ejecución de un ejercicio intenso y crónico. Con relación a esta última variable Foster y Harris [18] han establecido que los valores plasmáticos en el equino en reposo son: 28,4 $\mu\text{mol/l}$ en el caballo y 25,5 $\mu\text{mol/L}$ en la yegua, estos valores pueden disminuir significativamente en los 70 minutos subsiguientes a una sesión de ejercicio intenso. Por su parte Van Den Hoven y col. [61], analizando dos grupos de caballos, reportaron que el grupo de equinos que presentaron niveles plasmáticos más bajos de L-carnitina plasmática en reposo, fue el más proclive a sufrir rhabdomiólisis por ejercicio.

Con respecto a la rhabdomiólisis por ejercicio en el equino, es interesante señalar que su fisiopatología permanece aún en la oscuridad [57,59]. Pero a pesar de esto, se ha aceptado hasta el momento de que se trata de una entidad patológica en la cual pueden estar involucrados varios factores desencadenantes, tales como: la producción y acúmulo excesivo de ácido láctico y de radicales libres, combinado con aumento en las concentraciones de $[\text{H}^+]$ y por ende una disminución del pH intracelular. Así mismo, se han reportado aumento del

CO₂, disminución del ATP, así como hipoxia local y un concomitante efecto mecánico de tracción excéntrica ejercida sobre las fibras musculares durante el ejercicio [2, 37, 40, 55, 57]. Las condiciones bioquímicas antes señaladas que ocurren a nivel intramiocelular durante un ejercicio intenso, son las más propicias para el incremento en el catabolismo proteico [48]. Adicionalmente el catabolismo proteico y por ende la lisis miofibrilar, se ha asociado: a los cambios redox intramiocelulares, al aumento de amonio (debido a la activación de la enzima AMPdesaminasa) [13, 41], al aumento del ácido urico [32], al aumento del Ca²⁺ dentro del citosol que activa a las proteasas calpina (enzima no lisosomal) y catepsina (enzima lisosomal) que remueven la -actina que conectan los filamentos de actina con la línea Z [45] y a la lisis muscular [20, 56, 57].

En relación con la producción de radicales libres por efecto del ejercicio y sus posibles implicaciones citotóxicas en las fibras musculares, varios autores [14, 33, 53] han indicado que durante la ejecución de un ejercicio intenso, el incremento del flujo sanguíneo hacia el tejido muscular, puede provocar un aumento en la formación de superóxidos (O₂[•]) y por lo tanto un aumento en la lipoperoxidación [19, 42]. Tal afirmación se ha fundamentado en el hecho de que durante la fosforilación oxidativa en reposo, solo del 2 al 5% de las moléculas de oxígeno son reducidas a anión superóxido (O₂[•]), sin embargo durante la ejecución de un ejercicio intenso la producción de anión superóxido (O₂[•]), se puede incrementar [19, 39, 47, 50]. Tales sucesos bioquímicos en el músculo esquelético del equino podrían ser de mayor magnitud, debido a que esta especie, en comparación con el hombre y otras especies, posee una considerable capacidad aeróbica en sus músculos (fibras Tipo I y Tipo IIA, altamente oxidativas), así como una mayor capacidad de captación y utilización de oxígeno por parte de estos tipos de fibras musculares durante la realización de un ejercicio intenso [14].

Algunos autores como Rodemann y col. [50], McCord y col. [39] y Packer [47], han coincidido en señalar que la producción de radicales libres durante el ejercicio físico prolongado ocurre por un mecanismo complejo que depende de varios factores que en un momento determinado pueden interactuar. Tales factores son: 1° El músculo representa el 40% del peso corporal y consume de 20 a 40 veces más oxígeno durante el ejercicio que en reposo; 2° Durante la ejecución de un ejercicio intenso, se produce una disminución del ATP celular, lo cual trae como consecuencia una sobre carga del calcio citosólico y la apertura de las membranas fosfolipídicas (por cambio en la permeabilidad del sarcolema) con la salida de ácidos grasos libres, como el ácido araquidónico que por vía de la síntesis de prostaglandinas generarían radicales libres; 3° la disminución del ATP, genera aumento de la concentración de AMP, lo cual produce un catabolismo intenso de adenosina, inosina e hipoxantina que son los sustratos de la enzima xantino-oxidasa (XO); 4° El aumento de los sustratos de la enzima XO estimula en forma incrementada la conversión de la enzima xantino deshidrogenasa (XDH) a XO. Esta conversión XDH → XO produce por una parte la elevación de los radicales libres (debido

a la transferencia de electrones de la oxidación de la hipoxantina al oxígeno molecular, generándose el radical libre superóxido y peróxido de hidrogeno) y por la otra, la activación de proteasas calcio dependiente [5, 9] conducen a la lisis de los miofilamentos (tal como se indicó anteriormente) [20, 55].

De las estrategias que se han adelantado para minimizar la producción de especies reactivas de oxígeno durante la ejecución de un ejercicio intenso, se han recomendado la utilización de agentes antioxidantes, como lo constituyen la vitamina E y C [22, 47], el selenio [22] y el glutatión [45]. Asimismo, DiGiacomo y col. [10] pudieron determinar experimentalmente una disminución (directamente proporcional a las concentraciones crecientes de L-carnitina acetilada) en la concentración de la enzima XO a nivel muscular, y por tanto un aumento en el cociente XDH/XO, lo anterior permitió sugerir a Hanzawa y Watanabe [24] que la forma acetilada de la L-carnitina, podría tener un efecto antioxidante. Esta última aseveración, aunada a la función bioquímica de la L-carnitina de permitir la incorporación de lípidos estructurales (tal como se mencionó en párrafos anteriores), contribuyen indudablemente a proteger y estabilizar las membranas celulares y subcelulares de las fibras musculares esqueléticas.

La búsqueda de mecanismos de protección del músculo esquelético ante las eventuales injurias por efecto del ejercicio, ha generado una serie de investigaciones relacionadas con el análisis de la fisiopatología de la rabdomiólisis por ejercicio. En tales estudios se han abordado tópicos relacionados con los factores predisponentes del síndrome, dentro de los cuales se encuentra el efecto de la deficiencia de agentes antioxidantes (vitamina E y selenio) en el músculo esquelético del caballo [22].

El uso de la L-carnitina con fines terapéuticos y experimental ha demostrado que la misma es capaz de desempeñar diversos e importantes papeles, no solamente desde el punto de vista metabólico, sino además como agente antioxidante [10]. Este último aspecto motivó la realización de la presente investigación, con la cual se intentó dilucidar los efectos protectores de la L-carnitina sobre el músculo esquelético del CPSC sometido a un ejercicio de alta intensidad. Para tal fin, en el presente trabajo se empleó una herramienta metodológica importante en los estudios miológicos como lo constituye la microscopía electrónica de transmisión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para realizar la presente investigación se tomaron muestras del músculo *Gluteus medius* (biopsias por punción percutánea) a quince (15) CPSC machos, de tres (3) años de edad, clínicamente sanos y que se encontraban para el momento del estudio en entrenamiento completo (aptos para competencia) en el Hipódromo de Valencia, estado Carabobo. Asimismo se realizaron biopsias en cinco (5) animales (machos y de edades

comprendidas entre 3 a 4 años que para el momento de la toma de los especímenes de músculo, se encontraban inactivos por un período no menor de tres (3) meses. Los animales en estudio se dividieron en cuatro (4) grupos (G0, G1, G2 y G3) de cinco (5) animales cada uno. El criterio para dividir los tres grupos de ejemplares se basó en: Grupo 1 (G1), animales controles (sin L-carnitina exógena); Grupo 2 (G2), animales que se les administró por vía parenteral intravenosa (IV) 3g. de L-carnitina; Grupo 3 (G3), animales que se les administró 6g. de L-carnitina (IV) y el Grupo 0, conformado por animales inactivos.

Selección de la droga

La carnitina se administró en forma de clorhidrato de carnitina, con una concentración de 12,26 g/ml. La administración de la droga, se realizó tres (3) horas antes de la ejecución del ejercicio de alta intensidad, tomando en consideración las indicaciones del Laboratorio SANOFI de Toulouse-Francia que produce comercialmente el RIMOSINE®.

Evaluación de los ejemplares

Se realizó una evaluación antes y después de la ejecución del ejercicio de alta intensidad en los animales seleccionados, la misma consistió en un análisis clínico, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria.

Muestras de músculo

Las muestras se tomaron de la porción ventral del músculo *Gluteus medius*, siguiendo la técnica de biopsia muscular por punción percutánea descrita por Lindholm y Piehl [36], para la toma de las muestras se utilizó, la aguja de biopsia muscular diseñada por Bergström [3]. 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. [38]. Los especímenes de muestras (aprox. 250mg), se dividieron en dos porciones, una destinada para el análisis de la producción del ATP muscular, y la otra para el estudio ultraestructural de las fibras musculares esqueléticas.

Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión

Bloques de músculo de aproximadamente 2mm de diámetro fueron fijados en glutaraldehído buffer fosfato enfriado (pH 7,4 y 320mOsmol), postfijado in 1% OsO₄, deshidratado en etanol y embebido en Epon. Secciones ultra finas fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo y observadas en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H-500 con un voltaje de aceleración 100kV. Los cortes gruesos (1-2 μm) fueron teñidos con azul toluidina para la orientación de los cortes finos, se observaron por microscopía óptica.

RESULTADOS

Aspectos ultraestructurales del músculo esquelético sano

Los estudios ultraestructurales del músculo *Gluteus medius* de los caballos pura sangre controles G0, permitió identificar tres tipos de fibras musculares esqueléticas (I, IIA, y IIB). El criterio usado para identificar estos tipos de fibras, fue los propuestos por Finol [15], tales criterios son: trazo y grosor de la línea Z, presencia de la línea M, disposición de los filamentos finos alrededor de los gruesos a nivel de la banda A, desarrollo del sistema sarcotubular, número de mitocondrias, y presencia de gotas lipídicas. En la FIG. 1 se aprecia una sección longitudinal de una fibra Tipo IIA, en esta micrografía electrónica se exhiben mitocondrias en los espacios, así como la presencia de gotas lipídicas. La línea Z se caracterizó en este tipo de fibra por ser gruesa y de trazo rectilíneo.

Aspectos ultraestructurales del efecto protectorio de la L-carnitina sobre el músculo esquelético

El estudio ultraestructural del músculo *Gluteus medius* de los CPSC, sin el suministro exógeno de L-carnitina (G1) muestra que el ejercicio físico de alta intensidad produjo alteraciones similares a las observadas en otros procesos miodegenerativos subletales en las fibras musculares. En este sentido, los hallazgos histopatológicos se caracterizaron por atrofia de las fibras musculares esqueléticas (posiblemente debido a la pérdida de material contráctil) y por

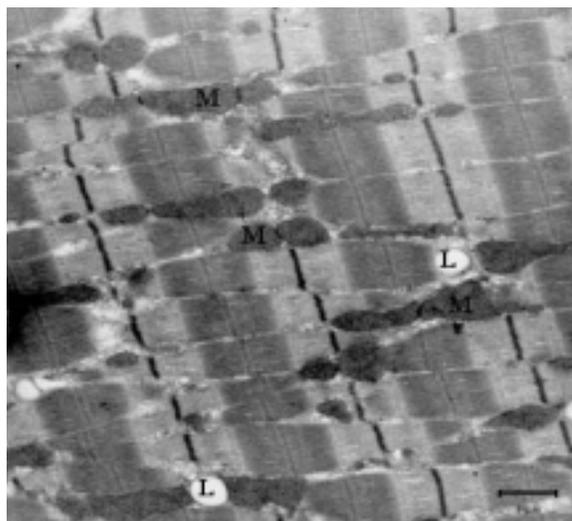


FIGURA 1. MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA CORRESPONDIENTE A UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE FIBRAS TIPO IIA, CORRESPONDIENTES A UN ESPÉCIMEN DE BIOPSIA MUSCULAR DEL MÚSCULO *GLUTEUS MEDIUS*, OBTENIDO DE UN EJEMPLAR CONTROL (G0), SE PUEDE APRECIAR MITOCONDRIAS ELECTRÓN DENSAS (M), ASÍ COMO GOTAS LIPÍDICAS (L), UBICADAS EN LOS ESPACIOS INTERMIOFIBRILARES. AUMENTADO 14.000X. EN ESTA Y LAS DEMÁS MICROFOTOGRAFÍAS ELECTRÓNICAS LA BARRA REPRESENTA 1 μm.

ende, incremento en los espacios intermiofibrilares (FIGS. 3 y 4). La línea Z se caracterizó por presentar un trazo irregular (FIG. 4). La pérdida de miofilamentos, posiblemente, provocó los diferentes grados de plegamientos del sarcoléma evidenciados (FIG. 2). Por su parte, las mitocondrias exhibieron un aspecto electrón denso (FIGS. 2, 3 y 4), y electrón lucen (hinchadas) (FIG. 2), así como gránulos intramitocondriales (FIG. 3). Es notable señalar la presencia frecuente de gránulos de lipofucsina (FIGS. 2 y 3). Por su parte, los capilares exhibieron prolongaciones del endotelio capilar hacia el lumen capilar (FIG. 2).

El análisis ultraestructural de las fibras musculares esqueléticas de los grupos de animales a los cuales se les suministró L-carnitina (3 y 6 g) por vía IV, sugieren que el efecto protector de la L-carnitina sobre el músculo esquelético de los CPSC sometidos a un ejercicio de alta intensidad, se caracterizó en términos generales por ser dosis dependiente. Con relación a esto, se observó en los animales a los cuales se les suministró por vía IV 3g de L-carnitina (previo a la realización del ejercicio de alta intensidad), una leve pérdida del material contráctil y edema de las cisternas terminales, a pesar del aspecto normal de las sarcómeras (FIG. 5).

Por su parte los animales a los cuales se les administró 6g de L-carnitina (IV), exhibieron fibras con aspecto normal (FIG. 6) y las mitocondrias en su gran mayoría presentaron un aspecto electrón denso (FIGS. 6 y 7), aunque algunas lucieron hinchadas (FIG. 7) después de la realización del ejercicio físico de alta intensidad.

DISCUSIÓN

Los hallazgos ultraestructurales en los especímenes de biopsia muscular después de la ejecución del ejercicio de alta intensidad, se pueden enmarcar dentro de las alteraciones descritas en otros procesos miodegenerativos, como subletales. Adicionalmente, las alteraciones observadas fueron dependientes de la dosis de L-carnitina suministrada antes de la ejecución de la actividad física. En este sentido, se apreciaron en los animales del Grupo 1 (sin L-carnitina), cambios en el sistema contráctil (pérdida de miofilamentos y trazo irregular de la línea Z). Tales alteraciones han sido descritas por otros autores en la fase subclínica [20, 55] y clínica [36, 55, 60] de la rabdomiólisis por ejercicio en el equino. Es interesante señalar que en las muestras correspondientes a los ejemplares del Grupo 2 (con 3g IV de L-carnitina antes del ejercicio) y Grupo 3 (con 6g IV de L-carnitina antes del ejercicio), sólo en los caballos del Grupo G2 se evidenció un ligero aumento en los espacios intermiofibrilares.

De los cambios a nivel mitocondrial, la presencia de gránulos intramitocondriales en las muestras de músculo del G1 posterior al ejercicio de alta intensidad, concuerda con descripciones similares y anteriores en miopatías inducidas por el ejercicio en caballos trotones (standarbred) [36] y CPSC [27,55].

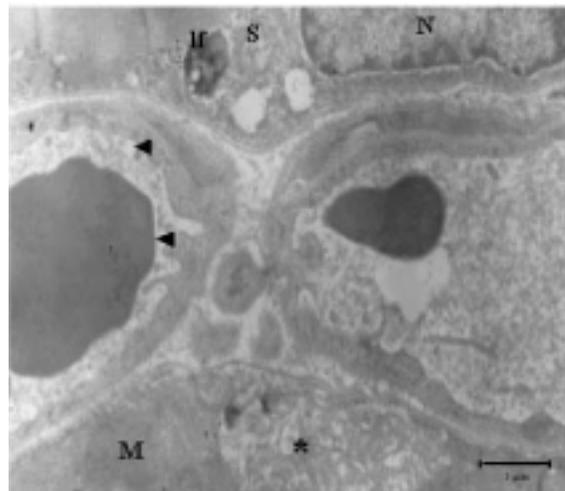


FIGURA 2. SECCIÓN LONGITUDINAL, CORRESPONDIENTE A UN ESPÉCIMEN DE BIOPSIA MUSCULAR, OBTENIDO DE UN EJEMPLAR DEL GRUPO CONTROL (G1), POSTERIOR A LA EJECUCIÓN DE UN EJERCICIO DE ALTA INTENSIDAD, SE EXHIBEN A NIVEL SUBSARCOLÉMICO, LA PRESENCIA DE MITOCONDRIAS CON ASPECTO ELECTRÓN DENSO (M), ASÍ COMO MITOCONDRIAS HINCHADAS (*). NÓTESE LA PRESENCIA DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA (LF), ASÍ COMO DE UN MIONÚCLEO (N) CON ASPECTO NORMAL. A NIVEL DE LOS CAPILARES, SE HACEN EVIDENTES LAS PROLONGACIONES DEL ENDOTELIO HACIA EL LUMEN (CABEZAS DE FLECHA). AUMENTO 16.000X.

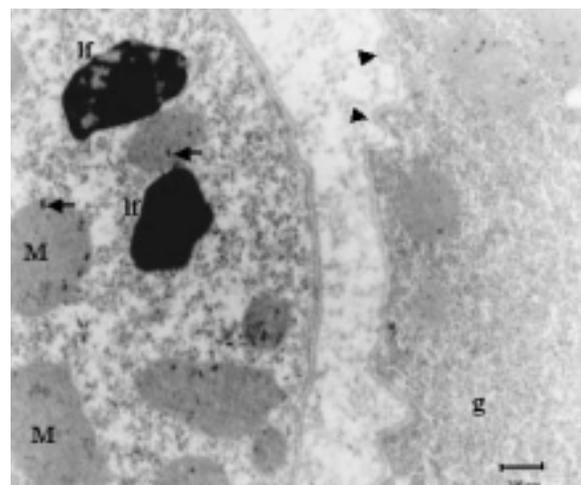


FIGURA 3. SECCIÓN LONGITUDINAL, CORRESPONDIENTE A UN ESPÉCIMEN DE BIOPSIA MUSCULAR, OBTENIDO DE UN EJEMPLAR DEL GRUPO CONTROL (G1), POSTERIOR A LA EJECUCIÓN DE UN EJERCICIO DE ALTA INTENSIDAD, SE EXHIBEN A NIVEL SUBSARCOLÉMICO, LA PRESENCIA DE GRÁNULOS DE LIPOFUCSINA (LF), MITOCONDRIAS CON ASPECTO ELECTRÓN LUCEN (M), ASÍ COMO DE GRÁNULOS INTRAMITOCONDRIALES (FLECHAS). NÓTESE LA PÉRDIDA EVIDENTE DE MATERIAL CONTRÁCTIL, ASÍ COMO LA PRESENCIA DE GRAN CANTIDAD DE GRÁNULOS DE GLUCÓGENO (G). LAS CABEZAS DE FLECHA SEÑALAN LOS DIFERENTES GRADOS DE PLEGAMIENTO DEL SARCOLÉMA. AUMENTO 25.000X.

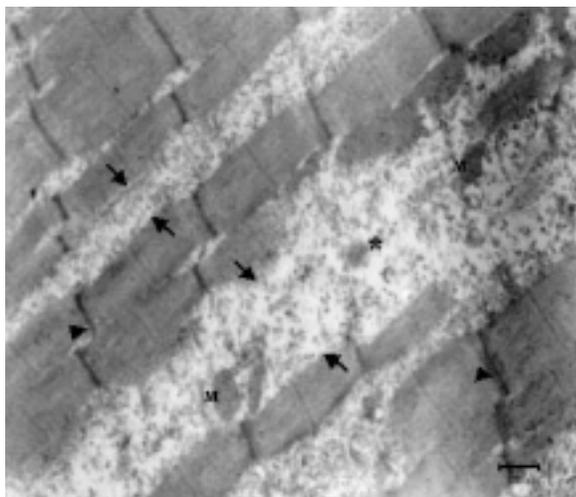


FIGURA 4. SECCIÓN LONGITUDINAL, CORRESPONDIENTE A UN ESPÉCIMEN DE BIOPSIA MUSCULAR, OBTENIDO DE UN EJEMPLAR DEL GRUPO CONTROL (G1), POSTERIOR A LA EJECUCIÓN DE UN EJERCICIO DE ALTA INTENSIDAD. EN ESTA MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA, SE APRECIA PÉRDIDA DE MATERIAL CONTRÁCTIL (*), TRAZO IRREGULAR DE LA LÍNEA Z (CABEZAS DE FLECHAS), Y MITOCONDRIAS CON ASPECTO ELECTRÓN DENSO (M). ENTRE FLECHAS EXHIBE EL AUMENTO DE LOS ESPACIOS INTERMIOFIBRILARES. AUMENTO 20.000X.

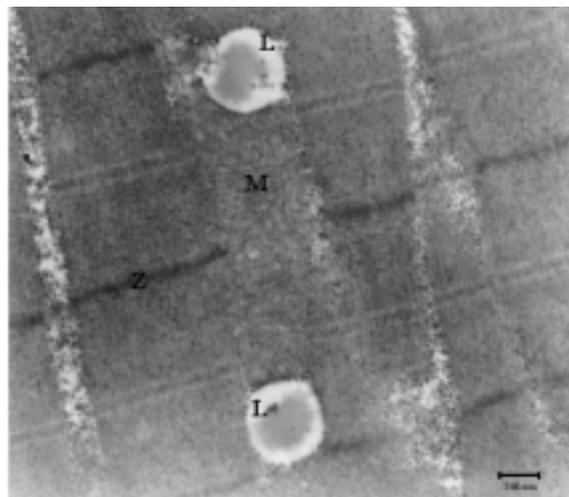


FIGURA 6. MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA CORRESPONDIENTE A UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UN ESPÉCIMEN DE BIOPSIA MUSCULAR DE UN EJEMPLAR DEL GRUPO QUE RECIBIÓ 6 G DE L-CARNITINA POR VÍA ENDOVENOSA (G3), 3 HORAS ANTES DE LA EJECUCIÓN DE UN EJERCICIO DE ALTA INTENSIDAD. EN ESTA SECCIÓN LONGITUDINAL, SE APRECIAN EN LOS ESPACIOS INTERMIOFIBRILARES, MITOCONDRIAS CON ASPECTO ELECTRÓN LUCEN (M), ASÍ COMO GOTAS LIPÍDICAS (L). NÓTESE EL ASPECTO NORMAL DE LAS SARCÓMERAS, ASÍ COMO DEL TRAZO REGULAR DE LA LÍNEA Z. AUMENTO 25.000X.

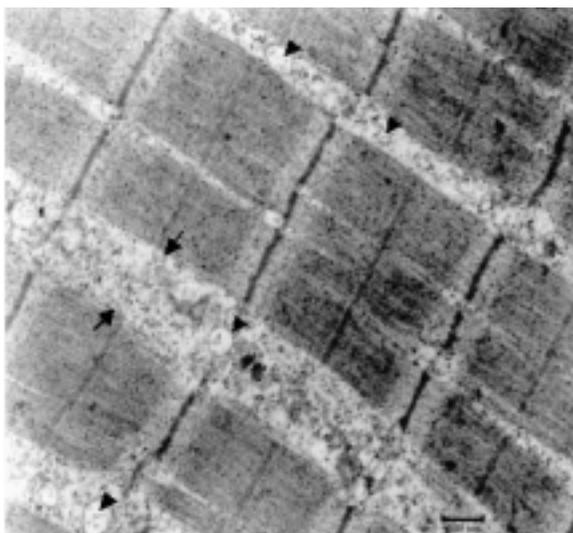


FIGURA 5. MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA CORRESPONDIENTE A UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UN ESPÉCIMEN DE BIOPSIA MUSCULAR DE UN EJEMPLAR DEL GRUPO QUE RECIBIÓ 3 G DE L-CARNITINA POR VÍA ENDOVENOSA (G2), 3 HORAS ANTES DE LA EJECUCIÓN DE UN EJERCICIO DE ALTA INTENSIDAD. EN ESTA SECCIÓN SE HACE EVIDENTE DE QUE A PESAR DEL LEVE INCREMENTO DE LOS ESPACIOS INTERMIOFIBRILARES (FLECHAS), Y DEL HINCHAMIENTO DE LAS CISTERNAS TERMINALES (CABEZA DE FLECHA), EL ASPECTO DE LA SARCÓMERA PARECE NORMAL. AUMENTO 25.000X.

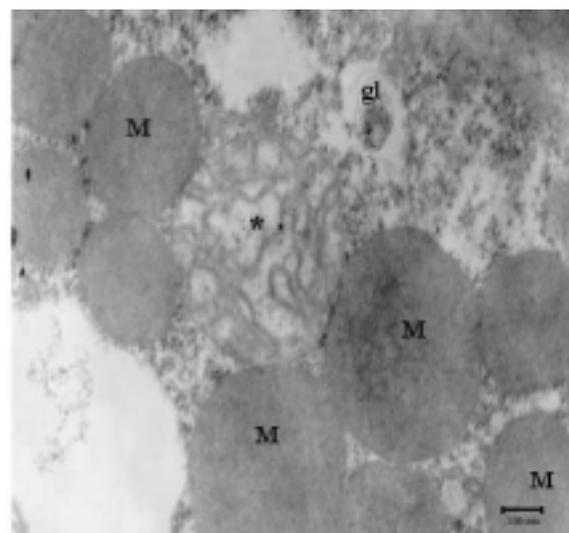


FIGURA 7. MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA CORRESPONDIENTE A UNA SECCIÓN LONGITUDINAL DE UN ESPÉCIMEN DE BIOPSIA MUSCULAR DE UN EJEMPLAR DEL GRUPO QUE RECIBIÓ 6 G DE L-CARNITINA POR VÍA ENDOVENOSA (G3), 3 HORAS ANTES DE LA EJECUCIÓN DE UN EJERCICIO DE ALTA INTENSIDAD. NÓTESE EN EL ESPACIO SUBSARCOLÉMICO, LA PRESENCIA DE MITOCONDRIAS CON ASPECTO ELECTRÓN DENSO (M), UNA MITOCONDRIA HINCHADA (*), ASÍ COMO UN GLUCOGENOSOMA (GL). AUMENTO 25.000X.

También se han señalado la presencia de estos gránulos intramitocondriales en miopatías en equinos, inducidas por la deficiencia de vitamina E y selenio [22]. Los gránulos intramitocondriales también observados, se han reportado en las miopatías experimentales inducidas por crotoquinas [51] y por el ejercicio físico en el músculo cardíaco [29] y en el esquelético [25].

La presencia de los gránulos intramitocondriales han sido asociados a disfunciones en los canales de calcio [12] y el resultado neto de esta disfunción consiste en un incremento en las concentraciones de calcio dentro del mioplasma. A consecuencia de estos eventos y como mecanismo compensatorio, las mitocondrias tratan de mantener la homeostasis del calcio intramiocelular, introduciéndolo dentro de ellas [27]. Una de las repercusiones nefastas de la alteración de la homeostasis del calcio a nivel intramiocelular es la activación de proteasas calcio dependiente (m-calpina y m-calpina) que son capaces de degradar los organelos intramiocelulares y originar la lisis de los miofilamentos [54].

La presencia frecuente de gránulos de lipofucsina en las muestras de especímenes de biopsias musculares del G1 de ejemplares, tomadas antes de la ejecución del ejercicio intenso, concuerda con lo señalado por otros autores que han aseverado que la acumulación de tales gránulos en las fibras musculares esqueléticas se podrían relacionar con el efecto de un esfuerzo físico sobre la fibra muscular esquelética [55]. Adicionalmente, estas estructuras, conocidas también con el nombre de pigmentos de la edad [16], se han observado con frecuencia en muestras de tejidos de animales viejos [8, 11, 16, 62].

Según Ying [62], los gránulos de lipofucsina son compuestos celulares resistentes a su catabolismo y por ende se acumulan inevitablemente como productos de desechos del metabolismo celular normal en los tejidos de los animales viejos [16]. Sin embargo, estos gránulos podrían representar estigmas de la lipoperoxidación de las biomembranas, inducidos por la producción y actuación de radicales libres debido al efecto de diferentes causas, dentro de las cuales se podría incluir el ejercicio físico [62]. En este contexto, los hallazgos de la presente investigación permiten sugerir que el efecto protector del suministro de L-carnitina antes de la ejecución del ejercicio físico intenso se reflejó en los Grupos G2 y G3 de ejemplares, previniendo la acumulación de lipofucsina en los especímenes de biopsias musculares. La contribución de la L-carnitina sobre la inhibición de la lipoperoxidación lipídica se ha asociado, con la prevención de la acumulación de gránulos de lipofucsina en tejidos tales como: en el cerebro [4] y en el miocardio isquémico [49, 52].

Las alteraciones en el sarcolema (diferentes grados de plegamientos), observadas en las muestras de especímenes del G1, coinciden con las descripciones similares en la rabdomiolisis por ejercicio en el humano [44] y en los CPSC [55].

Dentro de las anomalías observadas en los capilares intramusculares, la presencia de prolongaciones hacia la luz del capilar evidenciadas en las muestras del G1 (sin L-carnitina), aunque constituyen alteraciones inespecíficas, también

han sido observadas en varios desordenes musculares, como los reportados en la miopatía por efecto del *Toxoplasma gondii* [58] en la polimiositis [30] y en la rabdomiolisis por ejercicio [55]. Sin embargo, la presencia de tales prolongaciones, se han asociado también con la neoformación de capilares, inducidas por el ejercicio físico [63].

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se observaron cambios ultraestructurales que se pueden enmarcar dentro de un cuadro histopatológico como sub-letal en el grupo control, sin embargo, los hallazgos presentes en este estudio sugieren un posible efecto protector de la L-carnitina dosis dependiente sobre el músculo *GLUTEUS medius* cuando esta es administrada en un ejercicio físico de alta intensidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BALTHOLMEY, S.; SHERMAN, A. Postweaning carnitine supplementation of iron deficient rats. **J. Nutri.** Vol. 116. 2.190-2.200. 1986.
- [2] BEECH, J. Chronic exertional rhabdomyolysis. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, B: 145-167. 1997.
- [3] BERGSTROM, 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 diarrhea. **Scanned. J. Clin. Lab. Invest.** 14 suppl. 68p. 1962.
- [4] BIGGIO, G.; SPARO, P.; TOFFANO, G.; GESSA, G. Modulation of cerebral and peripheral transmitter functions. Edited by Liuiana press. Padua: 337p. 1986.
- [5] BINCOLI, A.; CAVALLINI, C.; RIGOBELLO, M.; COASSIN, M.; DIDISA, F. Modification of the xanthine-coverting enzyme of perfused rat heart during ischemia and oxidative stress. **Free Rad. Biolog. Med.** 4:163-167 1988.
- [6] BRASS, E.; HIATT, W. Carnitine metabolism during exercise. **Life Sci.**, 59: 1383-1393. 1994.
- [7] CERRETELLI, P.; MARCONI, C. L. Carnitine supplementation in humans. The effects on physical performance. **Inst. J. Sport. Med.**, 11: 1-14. 1990.
- [8] DALEFIELD, R.; PALMER, D.; JOLLY, R. Lipofuscin and abnormalities in colloid in the thyroid gland in relation to age. **J. Comp. Path.** 111: 381-399. 1994.
- [9] DELLA CORTE, E.; STIRPE, F. The regulation of rat liver xanthine oxidasa. **Bioch. J.** 126: 739-745. 1972.
- [10] DI GIACOMO, C.; LATTERI, F.; FICHERA, C.; SORRENTI, V.; CAMPISI, A.; CASTORINA, C.; RUSSO, A.; PINTURO, R.; VANELLA, A. Effect of acetyl-L-carnitine on lipid peroxidation and xanthine oxidase activity in rat skeletal muscle. **Neuroch. Res.** 18: 1157-1162. 1993.

- [11] DOLMAN, C.; MACLEOD, D. Lipofuscin and its relation to aging. In: **Advances in cellular neurobiology**. S. Federott and L. Hertz. Eds. Editions Academic Press. New York. Vol. 2: 205-2476. 1981.
- [12] DUAN, C.; DELP, M.; HAYES, D.; DELP, P.; ARMSTRONG, R. Skeletal Ca²⁺ overload and injury from eccentric exercise. **Med. Sci. Sport. Exerc.** 21: 580. 1989.
- [13] 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. Gillespie and N. Robinson. Eds. Editions Icept Publications. California. 456-463p. 1987.
- [14] EVANS, D.; ROSE, R. Maximum oxygen uptake in racehorses: changes with training state and prediction from submaximal cardiorespiratory measurements. In: **Equine Exercise Physiology**. 2. J. Gillespie and N. Robinson. Eds. Editions Icept Publications. California: 52-57p. 1987.
- [15] FINOL, H. Contribución al estudio de los tipos fibras en la musculatura estriada de los vertebrados. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Trabajo de Ascenso Venezuela. 25-63p. 1980.
- [16] FINOL, H. Contribución al estudio de la ultraestructura del músculo esquelético enfermo. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias (Trabajo de Ascenso). Caracas, Venezuela. 1986.
- [17] FOSTER, C.; HARRIS, R. Changes in free and bound carnitine in muscle with maximal sprint exercise in the thoroughbred horse. *Equine Exercise Physiology*. Eds. J. Gillespie and N. Robinson. Editions Icept Publications. California. 332-340p. 1986.
- [18] FOSTER, C.; HARRIS, R. Total carnitine content of the middle gluteal muscle of thorough bred horses: normal values, variability and effect of acute exercise. **Equine Vet. J.** 24: 52-57. 1992.
- [19] FRANKIEWIEZ-JUZKO, A.; FAFF, J.; SICRADZAN-GABELSKA, B. Changes in concentrations of tissue free radical marker and serum creatinekinase during the post-exercise period in rats. **Europ. J. Appl., Physiology**. 74: 470-474. 1996.
- [20] FRIDEN, J.; SEGER, J.; EKBLUM, B. Sublethal muscle fibre injuries after high-tension anaerobic exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.** 57: 360-368. 1988.
- [21] FRITZ, I. The effects of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates. **Acta Physiol. Scand.** 34: 367-385. 1955.
- [22] FUJIMOTO, Y.; MADARAME, H.; YSHIDA, H.; MORIGUCHI, R. Light and electron microscopic studies on muscular degeneration in foals. **Bull. Equine Res.** 23: 14-27. 1986.
- [23] GOROSTIAGA, E.; MAURER, C.; ECLACHE, J. Decrease in respiratory quotient. During exercise following L-carnitine supplementation. **Inst. J. Sport. Med.** 10: 164-174. 1989.
- [24] HANZANA, K.; WATANABE, S. Changes in osmotic fragility of erythrocytes during exercise in athletic horses. **J. Equine Sci.** 11: 51-61. 2000.
- [25] HEFFER, R.; BARRON, S. The early effects of ischemia upon skeletal muscle mitochondria. **J. Neurol. Sci.** 38: 294-315. 1978.
- [26] HODGSON, D. Muscular adaptations to exercise physiology. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** 1: 533-547. 1985.
- [27] HODGSON, D. Exercise-associated myopathy: is calcium the culprit. **Equine Vet. J.** 25: 1-3. 1993.
- [28] HOLLOSZY, J.; BOOTH, F. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. **Ann. Rev. Physiol.** 38: 273-291. 1976.
- [29] JENNINGS, J.; HERDSON, P.; SUMMER, H. Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. **Lab. Invest.** 29: 548-557. 1969.
- [30] JERUSALEM, F.; RAKUSA, M.; ENGEL, A.; MCDONALD, R. Morphometric study of muscle microvasculature. **Brain.** 97: 115-122. 1974.
- [31] KAKULAS, B.; ADAMS, R. Special categories of primary muscle disease. In: **Diseases of muscle**. Harper and Row. Eds 4th edition. Editions Publishers. Philadelphia. 311-668p. 1985.
- [32] KEENAN, D. Changes of blood metabolites in horses after racing with particular reference to uric acid. **Aust. Vet. J.** 55: 54-57. 1979.
- [33] KEHRER, J. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Rev. Toxicol.** 23: 21-48. 1993.
- [34] KHAN, L.; BRAMJI, M. Tissue carnitine deficiency: Triglyceride accumulation, concomitant impairment in fatty acid oxidation. **J. Nutri.** 109: 24-31. 1979.
- [35] LENNON, D.; SHRAGO, E.; MADDEN, M. Dietary carnitine intake related to skeletal muscle and plasma carnitine concentrations in adult men and women. **Amer. J. Clin. Nutr.** 43: 234-238. 1986.
- [36] LINDHOLM, A.; JOHANSSON, H.; KJAERGAARD, P. Acute rhabdomyolysis (Tying-up) in standardbred horses. A morphological and biochemical study. **Acta Vet. Scand.** 15: 325-339. 1974.
- [37] LINDHOLM, A.; PICHL, K. Fibre composition enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes I muscles of standardbred horse. **Acta Vet. Scand.** 15: 287-309. 1974.

- [38] LOPEZ-RIVERO, J.; MONTERDE, J.; MIRÓ, F.; MARTÍNEZ, A. Biopsia muscular con aguja percutánea en el caballo: descripción y aplicaciones. **One** 2^a. 81: 26-28. 1989.
- [39] MC CORD, J.; ROY, R.; SCHAFFER, S. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. **Adv. Myocard.** 5: 183. 1985.
- [40] MC EWEN, S.; HULLAND, T. Histochemical and morphometric evaluation of skeletal muscle from horses with exertional rhabdomyolysis (Tying-up). **Vet. Pathol.** 23: 41-417.1986.
- [41] MILLER, P.; LAWRENCE, L. The effect of submaximal treadmill training on heart rate, lactate and ammonia in quarter horses. In: **Equine exercise physiology**. 2. J. Gillispie and N. Robinson. Eds. Editions Icept Publications. California. 476-484p. 1987.
- [42] MILLS, PO.; SMITH, N.; HARRIS, C.; HARRIS, P. Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. **Res. Vet. Sci.** 62: 11-16. 1997.
- [43] MITCHELL, M. Carnitine metabolism in human subjects I. Normal metabolism. **Am.J. Clin. Nutri.** 31: 293-306. 1978.
- [44] O'REILLY, K.; WARHOL, M.; FIELDING, R.; FRONTERA, W.; MEREDITH, C.; EVANS, W. Eccentric exercise-induce muscle damage impairs muscle glycogen repletion. **J. Appl. Physiol.** 63: 252-256. 1987.
- [45] OUMI, M.; MIYOSHI, M.; YAMAMOTO, T. Ultrastructural changes and glutathione depletion in the skeletal muscle induced by protein mal nutrition. **Ultraest. Pathol.** 25: 431-436. 2001.
- [46] PAPANIMIRIOU, J.M.; MASTAGLIA, F.L. Ultrastructural changes in human muscle fibers in disease. Review **J. Submicro. Cit.** 14: 525-551. 1982.
- [47] PARKER, L. Oxygen radicals and antioxidants in endurance exercise. G. Genz, L. Parker, N. Siliprandi. Eds. Editions Elsevier Science. Amsterdam: 73-92p. 1986.
- [48] PARKHOUSE, W. Regulation of skeletal muscle myofibrillar protein degradation: relationship to fatigue and exercise. **Int. J. Bioch.** 20: 769-775. 1988.
- [49] PAULSON, D.; TRAXIER, J.; NOONAN, J.; SHUG, A. Effect of carnitine acetyl carnitine, propionyl carnitine-taurine amide on the ischemic hecort. **Feed. Proceed.** 44: 2058. 1985.
- [50] RODERMANN, H.; WAXMAN, L.; GOLDBERB, A. The stimulation of protein degradation in muscle by Ca²⁺ is mediated by prostaglandin E2 and does not require the calcium activates protease. **J. Biol. Chem.** 257: 8716-8723. 1982.
- [51] SHAH, A.; SAHGAL, V.; MUACHLER, G.; SUBRAMANI, V.; SING, H. Morphogenesis of the mitochondrial alterations in muscle diseases. **J. Nurol. Sci.** 55: 25-37. 1988.
- [52] SILIPRANDI, N.; DILISA, F.; ROSSI, C.; TONINELLO, A. Overview lipid metabolism. In: **Mycocardial Ischemia and Metabolism**. R. Ferrari, A.; Kate, A-Shug and O. Visioli. Plenum Press, New York. 1-10p. 1984.
- [53] SJODIN, B.; WESTING, Y.; APPLE, F. Biochemical mecanismos for oxygen free radical formation during exercise. **Sport. Med.** 10: 236-254. 1990.
- [54] SOZA, M.; KARPATI, G.; CARPENTER, S.; PRESCOTT, S. Calcium-induced damage reduced by calcium channel blockers. **Acta Neuropathol.** 71: 70-75. 1986.
- [55] SUCRE, L. Rabdomiolisis en el equino: análisis ultraestructural, histoquímico y bioquímico. Universidad Central de Venezuela. Tesis Doctoral. Mención Fisiología. Caracas, Venezuela. 150-580p. 1991.
- [56] SUCRE, L.; HERNÁNDEZ, N.; HECKER, S. Efecto del entrenamiento sobre las actividades enzimáticas y composición fibrilar en el M.G. medius de Caballos Pura Sangre Venezolanos. **Revista Científica. F.C.V-LUZ.** 9: 489-501. 1999.
- [57] SUCRE, L.; FINOL, H.; HECKER, S.; HERNÁNDEZ, N.; JORDAN, L. Rabdomiólisis por ejercicio en el caballo Pura Sangre de Carrera Venezolano: Análisis histoquímico, bioquímico y hematológico. **Revista Científica FCV/LUZ**, 6: 456.472. 2001.
- [58] TONINO, P.; FINOL, H.; MÁRQUEZ, A. Skeletal muscle capillary ultrastructure in *Toxoplasma gondii* parasitized mice. **Acta Cient. Venez.** 44: 349-354. 1993.
- [59] VALBERG, S.; MACLEAY, J.; MICKELSON, J. Exertional rhabdomyolysis and polysaccharde storase muopathy in horses. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** 19: 1077-1085. 1987.
- [60] VALBERG, S.; JONSSON, L.; LINDHOLM, A.; HOLMCREN, N. Muscle histopathology and plasma aspartate amiro tranferase, creatinekinasa and myoglobin changes with exercise in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. **Equine Vet. J.** 25: 11-16. 1993.
- [61] VAN DEN HOVEN, R.; BREUKINIK, H.; VAANDRAGER-VERDUIN, M.; SOLTÉ, H.; MEIJER. A normal resting values of plasma free carnitine and acyl carnitine in horses predisposed to exertional rhabdomyolysis. **Equine Vet. J.**, 21: 307-308. 1989.
- [62] YIN, D. Biochemical basis of lypofuscin, ceroid and age pigment-like fluorophores. **Free Rad. Biol. Med.**, 21: 871-888. 1996.
- [63] ZHOU, A.; EGGINTON, S.; BROWN, M.; HUDLICK, O. Capillary growth in overloaded, hypertrophic adult rat skeletal muscle: in ultrastructural study. **The Anat. Rec.**, 252: 49-63. 1998.