

ESTUDIO COMPARATIVO DE CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS DEL *M. gluteus medius* EN EQUINOS Y BOVINOS

A Comparative Study of Metabolic Characteristics of *M. gluteus medius* in Equines and Bovines

Noelina Hernández¹, Sonia H. Torres¹, Juan B. De Sanctis², M. Magdalena Pulido M.¹ y Luis E. Sucre P.[†]

¹Instituto de Medicina Experimental. E-mail: hernandn@ucv.ve, ²Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina,

[†]Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

Se hicieron comparaciones de las características metabólicas del *M. gluteus medius* de doce (12) caballos pura sangre y de cuarenta (40) vacas mestizas. La actividad de las enzimas citrato sintetasa (CS), β -hidroxiacilCoA deshidrogenasa (HAD) y hexoquinasa (HK) fue determinada mediante técnicas fluorométricas; la actividad de la enzima lipasa lipoproteica (ALPL), los niveles de ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos (TG), fueron medidos por técnicas espectrofotométricas, y la masa de la LPL (mLPL) mediante el inmunoensayo ELISA. La actividad de las enzimas CS, HAD y LPL fue mayor en los equinos que en los bovinos, mientras que la mLPL fue mayor en los bovinos. Los niveles de AGL y TG fueron similares en ambos grupos de animales. Se encontró una correlación positiva entre la actividad de las enzimas CS vs HAD y CS vs HK, tanto en los equinos como en los bovinos, y entre la HAD vs HK en los bovinos. Asimismo lo fue la actividad de la HAD vs la ALPL en las vacas. La ALPL también se correlacionó con la concentración de AGL en caballos y vacas, y con la concentración de TG en los caballos. Existe además correlación entre la actividad de la HAD y la concentración de TG, en los caballos. En síntesis, los resultados encontrados nos sugieren que existe una coordinación funcional entre las diversas rutas metabólicas, y que los animales más activos como los equinos, tienen un potencial aeróbico mayor que el de los animales menos activos, como los bovinos.

Palabras clave: Metabolismo aeróbico, actividad enzimática, músculo esquelético, caballos pura sangre, vacas.

ABSTRACT

Metabolic characteristics of *gluteus medius* muscles of twelve (12) thoroughbred horses and forty (40) hybrid cows were

compared. The activity of the enzymes citrate synthase (CS), β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HAD) and hexokinase (HK) was determined using fluorometric techniques. Lipoprotein lipase activity (LPLA), free fatty acids (FFA) and triglyceride levels were measured by spectrophotometric techniques, and lipoprotein lipase mass (LPL) was assessed by ELISA immunoassay. CS, HAD and LPL activities were higher in horses than in cows. However, LPL mass was higher in cows as compared to horses. FFA and TG were similar in both animal groups. Significant positive correlations between CS and HAD and between CS and HK activities in both equines and bovines were observed. Also HAD correlated with HK in bovines and HAD activity was related to LPLA in bovines. Moreover, a correlation was found between LPLA and FFA concentration both in horses and cows, and between LPLA and TG in horses. In summary, a functional correlation in different metabolic pathways is suggested by these results, and it is evident that more active species, such as horses, have a higher aerobic potential compared to less active species such as bovines.

Key words: Aerobic metabolism, enzyme activity, skeletal muscle, thoroughbred horses, cows.

INTRODUCCIÓN

Algunos animales domésticos son expuestos por el hombre a una gran actividad como por ejemplo el caballo que se utiliza en carreras, mientras que otros animales domésticos, de tamaño corporal similar, como las vacas pueden considerarse inactivos en comparación con los caballos de carrera [3]. Existe también un tipo de caballo salvaje que está incorporado a trabajos de resistencia en el medio rural y que es descendiente de los caballos andaluces traídos en la colonia [21]. El caballo pura sangre de carrera puede considerarse entonces como un animal atleta élite, por poseer entre otras peculiaridades, una alta capacidad aeróbica en sus fibras musculares esqueléticas [29, 30].

La plasticidad del músculo esquelético es tal, que cuando un animal es sometido a una actividad incrementada, éste sufre cambios profundos en sus características morfológicas y metabólicas. El grado de plasticidad puede conocerse al determinar la actividad de las enzimas claves que intervienen en las diversas rutas metabólicas de oxidación de compuestos musculares, los cuales proporcionan la energía necesaria para la actividad. La extensión con que se usa cada vía y lo importante de cada una en la producción de ATP, depende entre otras cosas de factores tales como la naturaleza y duración de la actividad física, el estado metabólico, el tipo de fibra muscular, su necesidad energética, y la disponibilidad de sustratos, influida ésta a su vez por la dieta y la cantidad de ejercicio [24, 26].

Con el ejercicio se ha descrito el incremento en la actividad de las enzimas oxidativas citrato sintetasa (CS), β -hidroxiacil-CoA-deshidrogenasa (HAD) [2, 4, 7, 8, 9, 15] y la lipasa lipoproteica (LPL) [12, 25, 34, 35, 37, 38], en contraparte a la disminución de las enzimas anaeróbicas, tal como la lactato deshidrogenasa [8, 9, 13].

En el presente trabajo se hace la determinación de las enzimas CS, HAD, hexoquinasa (HK) y LPL, en el músculo de caballos pura sangre de carrera, destinados a competencia y de vacas mestizas, destinadas a la cría, con el objeto de estudiar la capacidad metabólica. Esto fue complementado con el análisis de los sustratos: ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos (TG). Los resultados se utilizaron para poder establecer como un músculo que interviene activamente en la locomoción, el *gluteus medius*, se diferencia en dos especies de tamaño corporal similar, pero que realizan una actividad diferente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos estudiados

Se utilizó un grupo de doce caballos pura sangre, entrenados activamente, provenientes de los hipódromos "La Rinconada de Caracas" (n=4) y de "Valencia" (n=8), con edades comprendidas entre 3 y 5 años, y un grupo de cuarenta vacas mestizas, provenientes del estado Guárico. Las vacas pastaban libremente.

Toma de biopsias

Previa inyección por vía subcutánea con 3 ml de Clorhidrato de procaína (Novocaína[®], al 2%), se tomaron biopsias por punción percutánea, utilizando una aguja de Bergström, aproximadamente del mismo sitio del *M. gluteus medius* y procurando que todas las muestras se obtuvieran a una profundidad de 6 cm, según lo describe Sucre y col. [30].

Cada una de las muestras se dividió en dos porciones: una para el análisis bioquímico y la otra para inmunofluorescencia directa. Las muestras utilizadas para el análisis bioquímico, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y las usadas para inmunofluorescencia directa, fueron embebidas

en OCT (Ames Tissue Tek II) y congeladas en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Todas las muestras se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

Análisis bioquímico

Las actividades de las enzimas CS, HAD y HK fueron determinadas por las técnicas microfluorométricas descritas por Lowry and Passonneau [14]. Las lecturas se realizaron en un fluorómetro Perkin Elmer LS50. La actividad de estas enzimas se expresó en μ moles/min.g de músculo en peso húmedo (ph). La actividad de la enzima lipasa lipoproteica (ALPL), y los niveles de AGL y TG, se realizaron en muestras musculares homogeneizadas en una solución buffer 50 mM de NaOH, pH 8,5 y 0,1% de tritón X-100, y adaptando los micrométodos de Miles y col. [16] y de Woollett y col. [39]. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro EQUITY 1 + EPSON a 350 nm. La actividad de la LPL se expresó en pmoles AGL/h.mg de tejido muscular en peso húmedo (ph) y la concentración de AGL y TG en nmoles AGL/mg de músculo en ph.

Determinación de la masa de la lipasa lipoproteica (mLPL)

La masa total de la LPL fue medida mediante el inmunoensayo ELISA, utilizando anticuerpos purificados específicos para LPL, según la técnica descrita por Renier y col. [22]. Se usaron controles inter e intra ensayo con una variabilidad menor del 5%. Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado. Los resultados se expresaron en pg LPL/mg de músculo en ph.

El análisis de la especificidad del anticuerpo purificado fue realizado por Western blot, utilizando la técnica estándar de Towbin y col. [33]. Posterior a la electroforesis las proteínas ajustadas provenientes de músculos de caballo, vaca y humano fueron transferidas a un papel Nytran (Scheider and Schuel). Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 2% en buffer fosfato salino (PBS) por 1 h y luego expuestas al anticuerpo primario (dilución 1:200) y posterior al lavado, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo peroxidasa 1:2000. Posteriormente las membranas fueron incubadas con luminol (Pierce Biochemicals) y el film fotográfico fue procesado según las normas estándar.

Inmunofluorescencia directa para la identificación de la lipasa lipoproteica

Se utilizó el método descrito por Tifford [31], según se describe: Utilizando las biopsias musculares congeladas y montadas en el fijador OCT (Ames Tissue Tek II), se hicieron cortes transversales de 4-6 μ m de espesor, en un criostato, a -20°C. Los cortes se montaron en láminas cubiertas con gelatina, dejándose 10 minutos en reposo, y luego 10 minutos más en un baño en PBS a temperatura ambiente, para eliminar el OCT fundido y algún antígeno no asociado. Después de secar cuidadosamente los cortes, en las láminas, se le agregó a cada muestra 20 μ l de antisuero (IgG de conejo-anti LPL bovi-

no, conjugado con fluoresceína) y se incubó durante una hora en una cámara húmeda. Se eliminó el exceso del antisuero, con PBS, y se realizaron tres lavados consecutivos de 10 minutos, cada uno, con PBS. Las láminas con los cortes, ya secados, se montaron con glicerina al 10% en PBS. Las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia, en la oscuridad, y se tomaron fotografías de las láminas, usando una película ASA 400.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando la "t" de Student para muestras no pareadas. Se aplicó el análisis de correlación de Pearson entre las variables estudiadas. La hipótesis nula fue rechazada a un nivel de probabilidad del 0,05 ($P \leq 0,05$). Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media.

RESULTADOS

La actividad de las enzimas CS y HAD fue significativamente mayor en el grupo de caballos pura sangre que en las vacas (FIG. 1), mientras que la actividad de la enzima HK fue similar en ambos grupos de animales (FIG. 2).

Como se observa en la TABLA I, la ALPL en el *M. gluteus medius* fue significativamente mayor en los caballos que en las vacas; mientras que, el valor de la masa total de la LPL fue significativamente mayor en las vacas que en los caballos. Sin embargo, al cotejar los niveles de AGL y de TG (TABLA I), se encontró que estos fueron similares en ambos grupos de animales.

Mediante el análisis de inmunofluorescencia directa realizado en secciones transversales del *M. gluteus medius* de equinos (FIG. 3a, b) y de bovinos (FIG. 3c), se observó un patrón puntual de fluorescencia, que estaba localizado en los capilares (flechas) o intracelularmente (cabezas de flechas), lo cual se correspondía con el complejo LPL-IgG anti LPL. Como se observa en la FIG. 4, los anticuerpos utilizados para determinar la LPL, reconocen de igual modo a la enzima proveniente de las vacas como a la de los caballos.

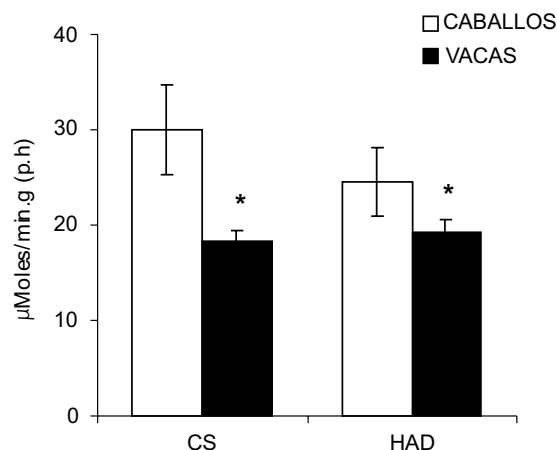


FIGURA 1. ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CITRATO SINTETASA (CS) Y β-HIDROXIACIL-COA-DESHIDROGENASA (HAD), EN EL *M. Gluteus medius* DE CABALLOS PURA SANGRE (n=12) Y VACAS (n=40). LOS PROMEDIOS ESTÁN EXPRESADOS EN μmoles/min.g EN PESO HÚMEDO (p.h) ± ES (P,0005; *P<0,025).**

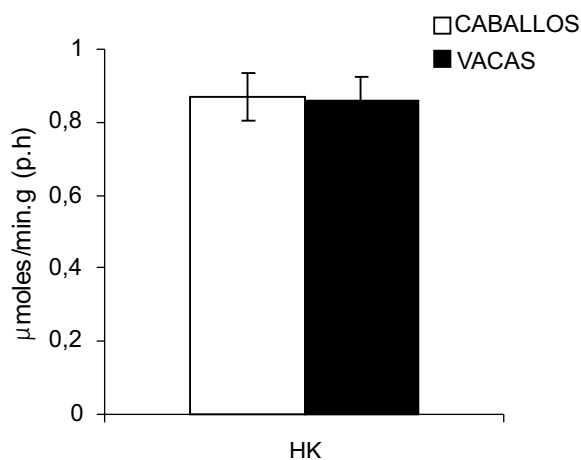


FIGURA 2. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA HEXOQUINASA (HK), EN EL *M. gluteus medius* DE CABALLOS PURA SANGRE (n=12) Y VACAS (n=40). LOS PROMEDIOS ESTÁN EXPRESADOS EN μmoles/min.g EN PESO HÚMEDO (p.h) ± ES.

**TABLA I
ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIPASA LIPOPROTEICA (ALPL), MASA DE LA LIPASA LIPOPROTEICA (mLPL), Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES [AGL] Y TRIGLICÉRIDOS [TG] EN EL *M. gluteus medius* DE CABALLOS PURA SANGRE Y VACAS**

	Caballos	Vacas	P
ALPL (pmoles AG/h.mg músculo)	1402 ± 137	880 ± 86	<0,005
mLPL (pg LPL /mg músculo)	13500 ± 2280	23220 ± 2280	<0,005
[AGL] (nmoles AGL/mg músculo)	102 ± 16	131 ± 14	<0,1
[TG] (nmoles AG/mg músculo)	112 ± 22	100 ± 11	<0,4

Valores = media \pm error estándar (en peso húmedo) Caballos: n=12 Vacas: n=40.

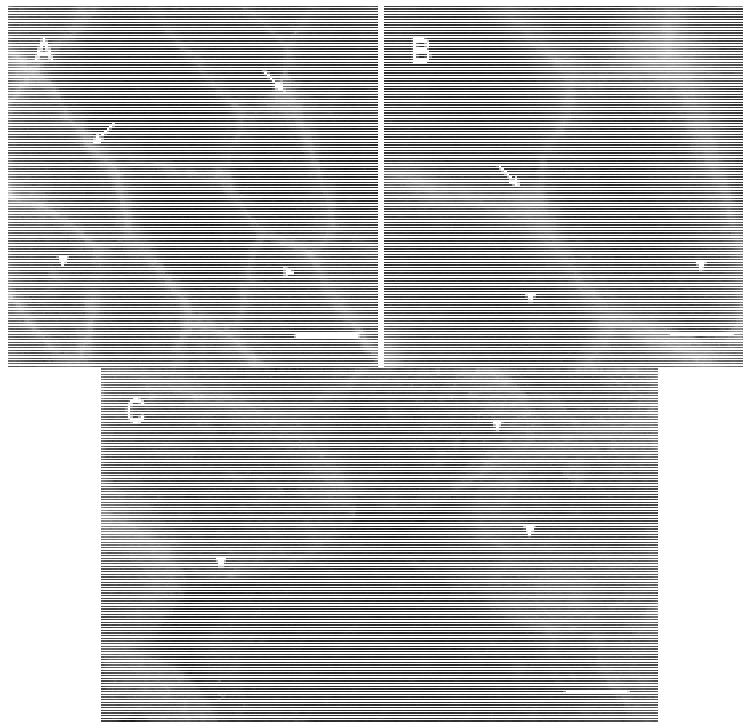


FIGURA 3. MICROFOTOGRAFÍAS TOMADAS CON LUZ ULTRAVIOLETA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LPL EN SECCIONES TRANSVERSALES DEL *M. gluteus medius* DE CABALLOS PURA SANGRE (A, B) Y DE VACAS (C), POR EL MÉTODO DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA. BARRA A Y C = 75 μ m. BARRA B = 300 μ m.

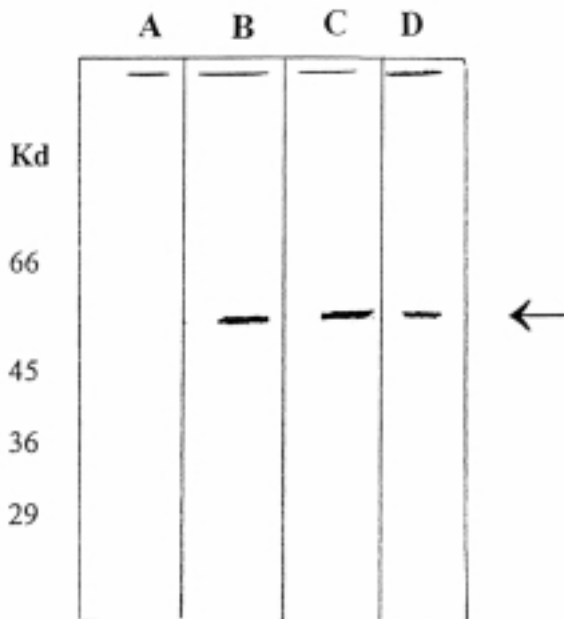


FIGURA 4. LA FIGURA ILUSTR A EL WESTERN BLOT REALIZADO, UTILIZANDO 20 μ g DE PROTEÍNA TOTAL/POZO. EN EL CARRIL A: SE UTILIZÓ UN EXTRACTO PROTEICO DE LINFOCITOS T HUMANOS PURIFICADOS (CONTROL NEGATIVO), EN EL CARRIL B: MUESTRA DE MÚSCULO DE VACAS, EN EL CARRIL C: MUESTRA DE MÚSCULO DE CABALLOS Y EN EL CARRIL D: UN EXTRACTO PROTEICO DE TEJIDO ADIPOSITIVO HUMANO. LA FLECHA REPRESENTA LA BANDA ESPECÍFICA DE LA LPL DE 57 Kd.

Al aplicar el análisis de correlación de Pearson entre las diferentes variables bioquímicas estudiadas en equinos y bovinos, se encontró que hubo correlación significativa entre la actividad de diversas enzimas, así como de los sustratos con las enzimas (TABLA II).

DISCUSIÓN

La determinación enzimática en el músculo esquelético de diversas especies, se ha relacionado con cambios adaptativos del metabolismo asociado con el entrenamiento. Se pueden utilizar ciertas enzimas claves para cuantificar la capacidad metabólica de un músculo. Por ejemplo la actividad de la HK, provee un índice cuantitativo de la utilización de la glucosa, la actividad de la CS, un indicador de la actividad del ciclo del ácido cítrico, la actividad de la HAD un indicador de la oxidación de los lípidos [30]. La LPL, una enzima clave en el metabolismo de las lipoproteínas y anclada a la superficie luminal del endotelio vascular, tiene como rol fundamental la hidrólisis de los triglicéridos de las lipoproteínas y quilomicrones circulantes; por este proceso se generan ácidos grasos los cuales son tomados por los tejidos [36].

Al comparar la actividad de las enzimas oxidativas CS y HAD, en el *M. gluteus medius* de los equinos y de los bovinos, ésta fue mayor en los equinos. Las diferencias en la actividad de estas enzimas oxidativas, encontradas en el mismo músculo de estos dos grupos de animales, obedecen no sólo a las características genéticas de estas especies, sino que están

TABLA II
CORRELACIONES (R) SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS VARIABLES EN EL *M. gluteus medius*
DE CABALLOS PURA SANGRE Y VACAS

		HAD (μ moles/min.g músculo)	HK (μ moles/min.g músculo)	ALPL (pmoles AG/h.mg músculo)
CS (μ moles/min.g músculo)	Caballos	R = 0,83 P <0,005	R = 0,77 P <0,005	
	Vacas	R = 0,60 P <0,0001	R = 0,45 P <0,025	
HAD (μ moles/min.g músculo)	Caballos			
	Vacas		R = 0,52 P <0,005	R = 0,68 P <0,01
AGL (nmoles AGL/mg músculo)	Caballos			R = 0,81 P <0,005
	Vacas			R = 0,81 P <0,005
TG (nmoles AGL/mg músculo)	Caballos	R = 0,74 P <0,005		R = 0,75 P <0,001
	Vacas			

determinadas por el nivel de actividad que éstos desarrollan, ya que como se mencionó el grupo de caballos pura sangre estaba en pleno período de entrenamiento, siendo sometidos a competencias de carreras, mientras que las vacas, a pesar de tener que caminar largas distancias en busca de sus alimentos, no estaban sometidas al estrés fuerte del ejercicio, como en el caso de los caballos.

Son diversas las investigaciones relacionadas con el entrenamiento y la actividad de las enzimas HK, HAD y CS, tanto en animales como en humanos. Henckel [5], no encontró modificación en la actividad de la CS y HAD después de un régimen de entrenamiento fuerte y por intervalos en caballos trotadores, mientras que Nimmo y col. [17], reportaron un pequeño incremento en estas enzimas en caballos. Igualmente, Peter y col. [19], Guy y Snow [4], Hodgsson [8], Hodgsson y col. [9] y McGowan y col. [15], reportan incremento en los niveles de estas enzimas; mientras que Cutmore y col. [2], encuentran aumento de la HK y CS en caballos, y Hernández y col. [7] incremento de las enzimas HAD y HK en gatos entrenados. Rivero y col. [23], señalan que los caballos con más alto performance, tienen mayor actividad de la CS y la HAD, una alta capacidad aeróbica y relativamente una baja capacidad anaeróbica en el *M. gluteus medius*, que los caballos con menor performance. Asimismo, Sucre y col. [30], trabajando con el *M. gluteus medius* de 10 caballos pura sangre venezolanos inactivos y 10 entrenados, encontraron mayor actividad de la HAD en el grupo de caballos entrenados que en los caballos inactivos, mientras que la actividad de las enzimas CS y HK, fue similar.

Essén-Gustavsson [3], utilizando biopsias del músculo glúteo de algunos animales domésticos y silvestres, reporta una diferencia similar en la actividad de la CS y de la HAD. Esta activi-

dad fue mayor en animales entrenados y silvestres, los cuales son muy activos, como es el caso del caballo, y menor en animales menos activos como los cerdos, las vacas y los toros. Al parecer, la actividad de estas enzimas está fuertemente influida por el nivel de actividad del músculo y del animal. Es notable que cuando se le impone una alta actividad al músculo, como sucede con las vacas que pastan, en comparación con las vacas mantenidas en establos, hay un aumento significativo de la actividad enzimática. Essén-Gustavsson [3] encontró además, correlación en la actividad de estas enzimas.

Estos resultados demuestran claramente que el nivel de actividad alcanzado por una enzima, se corresponde con las adaptaciones metabólicas observadas en respuesta a la actividad contráctil en una especie dada, pudiendo no reflejar necesariamente la respuesta metabólica adaptativa de otra especie. Esto sugiere que las respuestas metabólicas de músculos homólogos a cantidades similares de actividad contráctil incrementada, están limitadas por rangos de adaptación especie-específica. Aunque en el trabajo de Quiñones y col. [21] no se hicieron determinaciones bioquímicas de las enzimas, se reporta que la capacidad oxidativa, medida por la reacción histoquímica de la nicotinamida-adenina-dinucleótido-reducido (NADH)-diaforasa, da una mayor proporción de fibras con capacidad alta, en los caballos salvajes del llano venezolano. Esta mayor capacidad oxidativa, junto con la mayor proporción de fibras tipo I, así como el área mayor de todos los tipos de fibras que se reportan en los caballos salvajes, comparados con los caballos pura sangre de carrera, caracterizan su mayor resistencia a trabajos prolongados de baja intensidad. No es posible saber si estas características resultan de la adaptación a las condiciones de vida de estos caballos salvajes del llano venezolano y/o de las actividades que realizan, o si es el resultado de su herencia.

En humanos, Orlander y col. [18], evidenciaron cambios en la actividad de la CS después de 7 semanas de entrenamiento, señalando que la adaptación al entrenamiento prolongado de baja intensidad parece ser gradual hasta afectar la capacidad metabólica del músculo.

La correlación positiva encontrada entre la actividad de las enzimas HK vs CS, en caballos y vacas, entre la actividad de las enzimas CS vs HAD en caballos y vacas, y entre la HAD vs HK en vacas, nos sugiere un modelo de coordinación funcional entre las diversas rutas metabólicas.

Con la estimulación crónica del músculo tibial anterior del conejo, rata, acure y ratón, Simoneau y col. [28], reportaron que la HK responde de una manera específica aumentando su actividad al igual que las enzimas oxidativas, en vez de disminuirla como otras enzimas glicolíticas. Existen diferencias marcadas en las respuestas del músculo esquelético en éstos animales, con respecto a la extensión y curso de los cambios inducidos en la actividad de la HK, ya que durante la fase de adaptación inicial, hubo un aumento similar en la actividad de la HK, CS y HAD en el tibial anterior de todas las especies. No obstante, el aumento máximo se encontró en el conejo y la rata, lo cual corrobora que existen diferentes grados de adaptación especie-específica.

La estimulación crónica incrementa la actividad de la HK antes que la de algunas enzimas mitocondriales, tales como la CS, indicando esto que la fosforilación de la glucosa se asocia preferencialmente con la síntesis de ATP, mediante la fosforilación oxidativa [20]. Es así como el aumento en la actividad de las enzimas que intervienen en la oxidación de los sustratos terminales (Ciclo de Krebs, β -oxidación de los ácidos grasos y cadena respiratoria), ocurre en paralelo, manteniendo constante la proporción de estas enzimas. El aumento de las enzimas oxidativas va acompañado de una alta proporción de fibras oxidativas tipo I en el *M. gluteus medius* [6].

El suponer que las vías metabólicas, tanto en los equinos como en los bovinos están estrechamente acopladas, como ocurre en otras especies, nos lleva a considerar que los incrementos en los niveles de la HAD y CS podrían ser paralelos al aumento de la LPL. Siendo que la APLP está relacionada con el grado de capilaridad del músculo esquelético, puede esperarse que ésta se eleve, cuando aumenta la densidad capilar por efecto del entrenamiento físico. El ejercicio prolongado causa un incremento agudo pronunciado en la actividad de la LPL. De tal manera que la mayor actividad de la LPL encontrada en los caballos entrenados que en las vacas, podría deberse a la presencia de una mayor cantidad de capilares con más sitios de enlace para la LPL [6, 25]. El ejercicio prolongado también incrementa la tasa de oxidación de las grasas. Esto puede ser explicado parcialmente en base a: transporte incrementado de AGL a los músculos en ejercicio, la concentración elevada de AGL plasmáticos, y la hiperemia inducida por el ejercicio [32]. En adición a los cambios locales en el músculo en ejercicio, se puede considerar además la oxida-

ción incrementada de los AG, la hidrólisis incrementada de TG almacenados en el músculo (más pronunciada en sujetos entrenados), y el incremento de actividad de la LPL en el músculo en ejercicio [1, 12, 27].

En el presente trabajo, la actividad de la LPL fue mayor en el grupo de equinos que en el de bovinos, sin embargo, la masa total de esta proteína fue mayor en el grupo de bovinos. Esta última diferencia podría deberse, parcialmente, al alto contenido de tejido adiposo adyacente a las fibras musculares en las vacas, de tal manera que al procesar la muestra muscular proveniente del *M. gluteus medius* de estos animales, posiblemente se tomó cierta cantidad de tejido adiposo, lo cual pudo incrementar la masa total de la LPL.

En humanos Karpe y col. [10], reportaron que en estado postabsortivo y postprandial, la LPL se libera al plasma, no obstante, existen diferencias entre los tejidos; el músculo esquelético libera LPL activa al plasma, mientras que el tejido adiposo no; la mLPL (enzima inactiva), se libera consistentemente desde el tejido adiposo y menos desde los músculos. La diferencia marcada entre estos tejidos, sirve de argumento para explicar la diferencia de los mecanismos tejido-específicos en la asociación de la LPL al endotelio vascular.

Es de hacer notar que la LPL se acumula intracelularmente en estructuras membranosas, siendo liberada al medio extracelular en su forma activa, por acción de secretagogos, o por el ejercicio, de modo que cuando hay poca actividad muscular, la enzima se secreta menos, acumulándose dentro de la célula donde es degradada. La acumulación intracelular de esta proteína, podría incrementar su masa total, como sucede en las vacas. Al respecto, Vannier y Ailhaud [35], reportaron la presencia de dos vías secretorias para la LPL, una constitutiva, por la cual se secreta un 20% de la enzima, y la regulable que secreta el 80% de la proteína restante. Esta última, es la vía activada por el ejercicio.

Mediante análisis de inmunofluorescencia, Vannier y col. [37], encontraron en células adiposas que una gran porción de la enzima LPL estaba localizada en el aparato de Golgi donde ocurre la activación de la enzima. Esta localización intracelular, favorece la hipótesis de que la LPL es una proteína secretoria, que puede ser secuestrada en estructuras de membrana.

En el presente trabajo, a pesar de que el anticuerpo (IgG de conejo-anti LPL de bovino conjugado con fluoresceína) utilizado en el análisis de inmunofluorescencia directa para poner de manifiesto la presencia de la LPL fue obtenido de leche bovina, en las micrografías tomadas del *M. gluteus medius* de bovinos, a diferencia de los equinos, no se observó fluorescencia en los capilares. Es factible que la LPL secretada mediante la vía regulable por los bovinos, sea menor que la secretada por los equinos, ya que la secreción de esta enzima, entre otras cosas, depende del nivel de actividad del animal y de la capilaridad del músculo comprometido, siendo estas dos condiciones, mayores en los equinos que en los

bovinos [6, 12, 34, 35, 37, 38]. Sin embargo, en la FIG. 3c se observa mayor contenido de LPL (forma activa e inactiva de LPL) en las fibras musculares de los bovinos, que en la de los equinos (FIG. 3a y 3b).

Se conoce que los músculos mejores entrenados son los más aptos para el trabajo, ya que su suplemento energético lo derivan principalmente de la hidrólisis de los TG intramusculares, obteniéndose AGL, que luego son oxidados aeróbicamente, mientras que los sujetos desentrenados derivan su aporte energético de los AGL provenientes del plasma y/o de los carbohidratos [1, 11]. De ahí que los caballos pura sangre, animales sometidos a constante entrenamiento, deben poseer mayor contenido de TG en sus músculos. No obstante, en el presente trabajo solo se encontró un valor ligeramente superior de TG en los músculos de los equinos, que en el de los bovinos. Sin embargo, al comparar a estos dos grupos de animales, las vacas poseen mayores depósitos de grasas neutras fuera de sus fibras musculares, depósitos que posiblemente no fueron eliminados totalmente al seleccionar la muestra muscular, lo cual pudo influir en la determinación, tanto de la concentración de TG como de AGL.

Si se considera que la LPL al estar anclada en la matriz extracelular hidroliza a los TG produciendo AGL, los cuales al ser captados por el músculo entran a la vía de la beta oxidación, donde la HAD es una enzima clave de esta ruta metabólica, esto corroboraría la correlación positiva encontrada entre la ALPL y la concentración de AGL en ambos grupos de animales y entre las enzimas LPL y HAD en las vacas.

CONCLUSIONES

Los caballos pura sangre de carrera, animales más activos que las vacas y con un mayor potencial aeróbico en el *M. gluteus medius*, presentaron valores más elevados de las enzimas oxidativas CS, HAD y de la enzima LPL, que los de los animales menos activos, de tamaño corporal similar, como son las vacas.

Las correlaciones encontradas entre la actividad de las enzimas CS vs HAD y CS vs HK en caballos y vacas, entre la HAD vs HK y entre la HAD vs LPL en las vacas, nos sugieren que existe una coordinación funcional entre las diversas rutas metabólicas de estas enzimas.

La relación entre los TG y la actividad de la LPL en los caballos es un índice de la inducción de la enzima por el sustrato. Asimismo, al haber mayor actividad de la enzima LPL se producen más AGL, lo cual explica la correlación hallada entre sus valores.

La actividad de la HAD mostró correlación con los niveles de TG en los caballos, lo cual sugiere que la hidrólisis de éstos va acompañada de la beta oxidación de los AG.

AGRADECIMIENTO

Este estudio fue financiado parcialmente por: Proyecto SI-2000000149 de FONACIT y por la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BULLOW, J. Regulation of lipid mobilization in exercise. **Cand J Spt Sci.** 12 (Suppl 1):117S-119S. 1987.
- [2] CUTMORE, C; SNOW, D; NEWSHOLME, E. Activities of key enzymes of aerobic and anaerobic metabolism in middle gluteal muscle fro trained and untrained horses. **Equine Vet J.** 17:354-356. 1985.
- [3] ESSÉN-GUSTAVSSON, B. Activity- and inactivity-related muscle adaptation in the animal kingdom. **Biochemistry of Exercise VI.** International Series on Sport Sciences. Human Kinetics Publishers, Champaign, Illinois. 16:435-444. 1986.
- [4] GUY, P; SNOW, D. The effect of training and detraining on muscle composition in the horse. **J Physiol.** 269:33-51. 1977.
- [5] HENKEL, P. Training and growth induced changes in the middle gluteal muscle of young standardbred trotters. **Equine Vet.** 15:134-140. 1983.
- [6] HERNÁNDEZ, N; TORRES, S.H; PULIDO, M.M; SUCRE P, L.E. Estudio comparativo de la proporción de tipos de fibras y de la capilaridad del *M. gluteus medius* en equinos y bovinos. **Rev Científ, FCV-LUZ.** XIII (2):122-129. 2003.
- [7] HERNÁNDEZ, N; TORRES, S.H; RIVAS, M. Inactivity changed fiber type proportion and Capillary supply in cat muscle. **Comp Biochem Physiol.** 117A (2):211-217. 1997.
- [8] HODGSSON, D.R. An uptake in equine exercise physiology research in North America and throughout the world. **California Vet.** 41:7-28. 1987.
- [9] HODGSSON, D; ROSE, R; DIMAURO, J; ALLEN, J. Effects of submaximal treadmill training programme of histochemical properties, enzyme activities and glycogen utilisation of skeletal muscle in the horse. **Equine Vet J.** 17:300-305. 1985.
- [10] KARPE, F; OLIVECRONA, T; OLIVECRONA, G; SAMRA, J.S; SUMMERS, L.K.M; HUMPHREYS, S.M; FRAYN, K.N. Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissue in regulations of plasma lipoprotein lipase concentrations. **J Lipid Res.** 39:2387-2393. 1998.

- [11] LAYZER, R. How muscles use fuel. **N Engl J Med.** 324:411-412. 1991.
- [12] LITHELL, H; CEDERMARK, M.M; FROBERG, J; TESCH, P; KARLSSON, J. Increase of lipoprotein-lipase activity in skeletal muscle during heavy exercise. Relation to epinephrine excretion. **Metabolism.** 30:1130-1134. 1981.
- [13] LÓPEZ-RIVERO, J.L. Effect of training on the skeletal muscle of horses (Review). **Agro-Ciencia.** 11:71-85. 1995.
- [14] LOWRY, O; PASSONNEAU, J. **A flexible system of enzymatic analysis.** Academic Press. New York. 1-96 pp. 1972.
- [15] MCGOWAN, C.M; GOLLAND, L.C; EVANS, D.L; HODGSON, D.R; ROSE, R.J. Effects of prolonged training, overtraining and detraining on skeletal muscle metabolites and enzymes. **Equine Vet J. Suppl (34):**257-263. 2002.
- [16] MILES, J; GLASSCOCK, R; AIKENS, J; GERICH, J; HAYMOND, M. A microfluorometric method for determination of free fatty acids in plasma. **J Lipid Res.** 24:96-99. 1983.
- [17] NIMMO, M; SNOW, D; MUNRO, G. Effects of nandrolone phenylpropionate in the horse: Skeletal muscle composition in the exercising animal. **Equine Vet J.** 14:229-233. 1982.
- [18] ORLANDER, J; KLISSLING, K; KARLSSON, J; EKBLOM, B. Low intensity training, inactivity and resumed training in sedentary men. **Acta Physiol Scand.** 101:351-362. 1977.
- [19] PETER, J; JEFFRESS, R; LAMB, D. Exercise: Effects on hexokinase activity in red and white skeletal muscle. **Scien.** 163:200-201. 1968.
- [20] PETTE, D. Regulation of phenotype expression in skeletal muscle fibers by increase contractile activity. **Biochemistry of Exercise VI.** International Series on Sport Sciences. Human Kinetics Publishers, Champaign, Illinois. 16:3-26. 1986.
- [21] QUIÑONES, ME; SUCRE P, LE; TORRES, SH; FINOL, HJ. Comparación en la composición de los principales miofenotipos de fibras musculares esqueléticas del *M. G. medius*, entre caballos venezolanos pura sangre de carrera y salvajes. **Rev Científ, FCV-LUZ.** X (2):81-90. 2000.
- [22] RENIER, G; SKAMENE, E; DE SANCTIS, JB; RADZIOCH, D. High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strain with susceptibility to atherosclerosis. **Arterios Thromb.** 13:190-196. 1993.
- [23] RIVERO, J.L; SERRANO, A.L; HENCKEL, P. Activities of selected aerobic enzymes in the *gluteus medius* muscle of endurance horses with different performance records. **Vet Rec.** 137(8):187-192. 1995.
- [24] SALMONS, S; HENRIKSSON, J. The adaptive response of skeletal muscle to increase use. **Muscle Nerve.** 4:94-105. 1981.
- [25] SALTIN, B; GOLLNICK, P. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. **Handbook of Physiology.** Section 10: Skeletal muscle. Am Physiol Soc. Bethesda, Maryland. Chap 19. 555-631 pp. 1983.
- [26] SCHANTZ, P.G. Plasticity of human skeletal muscle. **Acta Physiol Scand.** (Suppl. 558):1-62. 1986.
- [27] SEIP, R.L; SEMENKOVICH, C.F. Skeletal muscle lipoprotein lipase: molecular regulation and physiological effects in relation to exercise. **Exerc Sport Sci Rev.** 26:191-218. 1998.
- [28] SIMONEAU, J; HOOD, D; PETTE, D. Species-specific responses in enzyme activities of anaerobic and aerobic energy metabolism to increased contractile activity. **Biochemistry of Exercise VII.** Edit. Taylor, A; Gollnick P; Green H; Iannuzzo C; Noble E; Métivier G; Sutton J. Human Kinetics Books. Champaign, Illinois. Vol 21:95-104. 1990.
- [29] SNOW, D.H. The horse and dog, elite athletes-why and how. **Proc Nutrition Soc.** 44:267-272. 1985.
- [30] SUCRE, LE; HERNÁNDEZ, N; HECKER-TORRES, S. Efecto del entrenamiento sobre actividades enzimáticas y composición fibrilar en el *M. Gluteus medius* de caballos pura sangre venezolanos. **Rev Científ, FCV-LUZ.** IX(6):489-501. 1999.
- [31] TITFORD, M. Basic immunofluorescence in the histology laboratory. **Lab Med.** 10:775-781. 1979.
- [32] TORRES, S.H; WIKINSKI, R; DOMINGUEZ, J. Effect of lipid infusion on substrate uptake in *soleus muscle* of the cat. **Acta Científ Ven.** 41:33-39. 1990.
- [33] TOWBIN, H; STAHELIN, T; GORDON, J. Immunoblotting in the clinical laboratory. **J Clin Chem Clin Biochem.** 27(8):495-501. 1989.
- [34] VANNIER, C; AILHAUD, G. A continuous method for the study of lipoprotein lipase secretion in adipose cells. **Biochem Biophys Acta.** 875:324-333. 1986.
- [35] VANNIER, C; AILHAUD, G. Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. II. Processing, subunit assembly, and intracellular transport. **J Biol Chem.** 264:13206-13216. 1989.
- [36] VANNIER, C; AMRI, E.Z, ETIENNE, J; NEGREL, R; AILHAUD, G. Maturation and secretion of lipoprotein lipase

- in cultured adipose cells. I. Intracellular activation of the enzyme. **J Biol Chem.** 10; 260(7):4424-31. 1985.
- [37] VANNIER, C; ETIENE, J; AILHAUD, G. Intracellular localization of lipoprotein lipase in adipose cells. **Biochem Biophys Acta.** 875:344-354. 1986.
- [38] VANNIER, C; DESLEX, S; PRADINES-FIGUERES, A; AILHAUD, G. Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. I. Characterization of a specific antibody and relationships between the intracellular and secreted pools of the enzyme. **J Biol Chem.** 264:13199-13205. 1989.
- [39] WOOLLETT, L; BEITZ, C; HOOD, R; APRAHAMIAN, S. An enzymatic assay for activity of lipoprotein lipase. **Anal Biochem.** 143:25-29. 1984.