



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**EFEECTO DEL ETANOL Y EJERCICIO EN EL MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATA**

**Memoria que para optar al grado de
Doctora en Biología presenta:**
LUZDIVINA VILA FIDALGO

León, Julio 1996

D. Julio Gabriel Prieto Fernández y dña. Ana Isabel Álvarez de Felipe, profesores titulares de Fisiología en el departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Universidad de León

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral, titulada "*Efecto del etanol y ejercicio en el músculo esquelético de rata*", ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Universidad de León, por la Licenciada en Biología Dña. Luzdivina Vila Fidalgo como trabajo para optar al grado de Doctora. Hallándose concluida y reuniendo a su juicio, las condiciones de originalidad y rigor científico necesarias, autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman este informe en León, Julio de 1996.

Fdo. : Dr. Prieto Fernández

Fdo.: Dra. Álvarez de Felipe

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**EFFECTO DEL ETANOL Y EJERCICIO EN EL MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATA**

LUZDIVINA VILA FIDALGO

A Sara

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis directores, los Dres. D. Julio G. Prieto Fernández y Dña. Ana I. Álvarez de Felipe, por su colaboración, apoyo y sobre todo por su gran amistad, que ha permitido, aún con gran esfuerzo, finalizar la presente memoria.

Al “chicharrín”, lugar de reunión de este equipo investigador, por contribuir en gran medida a sentar las bases de una gran amistad. Entre sus paredes Ana, Aurelia, Carlos, Encarna, Jesús Alberto, Jesús Luis, José Luis, Julián, Leticia, Mariano, Marisa Alonso, Marisa Fernández, Olga, Pedro, mis directores y yo misma hemos vivido momentos inolvidables.

A mis compañeros de los últimos días, por su gran colaboración ya que sin ellos esto no habría terminado.

A el Dr. D. Julián Zapico por su colaboración en las distintas fases del desarrollo de la presente memoria.

Al Dr. Ciriaco Díez Álvarez, analista clínico por su desinteresada colaboración en la realización de la analítica sanguínea.

A todos los miembros del departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología, con los que he trabajado durante estos años.

Un agradecimiento especial a mis padres, hermanas y sobrinos.

A Carlos Marcos.

En gran parte, el mérito de la presente Memoria corresponde a todas las personas citadas con anterioridad, pero, con total seguridad, son muchas más las que durante estos años han colaborado indirectamente en la consecución de la misma, ofreciendo su comprensión y su apoyo, por lo que a todas aquellas que se sientan aquí identificadas, quiero expresarles mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN.	15
2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.	19
2.1 FIBRAS MUSCULARES.	19
2.1.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS FIBRILARES.....	19
2.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES.....	23
2.1.3. POBLACIÓN Y TAMAÑO FIBRILAR.....	26
2.1.3.1. Diferencias dentro del músculo.....	27
2.1.4. FACTORES QUE MODIFICAN LA POBLACIÓN Y TAMAÑO FIBRILAR.....	28
2.1.4.1. Edad.....	28
2.1.4.2. Sexo y peso corporal.....	29
2.1.4.3. Efectos del ejercicio físico.....	30
2.1.4.3.1. Efecto sobre el tamaño fibrilar.....	32
2.1.4.3.2. Efecto sobre las proteínas contráctiles.....	34
2.1.4.3.3. Efecto sobre el perfil metabólico.....	36
2.2 ETANOL	37
2.2.1. ABSORCIÓN Y METABOLISMO.....	37
2.2.1.1. Absorción.....	38
2.2.1.2. Metabolismo.....	39
2.2.1.2.1. Metabolismo del acetaldehído.....	41
2.2.2. EFECTO DEL ETANOL SOBRE EL METABOLISMO.....	42
2.2.3. EFECTOS DEL ETANOL EN EL MÚSCULO.....	44
2.2.3.1. Miopatía alcohólica.....	44
2.2.3.1.1. Miopatía alcohólica aguda.....	45
2.2.3.1.2. Miopatía alcohólica crónica.....	46
2.2.3.1.3. Patogénesis de las miopatías.....	47

3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
3.1 MATERIALES.....	49
3.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	49
3.1.2. REACTIVOS.....	49
3.1.3. MATERIAL DE LABORATORIO.....	49
3.1.3.1. Aparatos de uso general.....	50
3.1.3.2. Material específico de análisis nemalológicos.....	50
3.1.3.3. Material específico para el desarrollo del ejercicio.....	50
3.1.3.4. Material específico para los análisis histoquímicos y morfométricos.....	50
3.2. METODOLOGÍA.....	51
3.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	51
3.2.2. ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DEL ETANOL.....	51
3.2.3. PROTOCOLO DE EJERCICIO.....	52
3.2.4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	52
3.2.4.1. Anestesia.....	52
3.2.4.2. Obtención y preparación de muestras de sangre.....	53
3.2.4.3. Obtención y preparación de músculos e hígados.....	53
3.2.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.....	53
3.2.5.1 . Parámetros Bioquímicos.....	53
3.2.5.1.1. Determinación de glucosa.....	53
3.2.5.1.2. Determinación de triglicéridos.....	54
3.2.5.1.3. Determinación de urea.....	54
3.2.5.1.4. Determinación de proteínas totales.....	54
3.2.5.2. Parámetros enzimáticos.....	54
3.2.5.2.1. Determinación de la aspartato-transaminasa (AST).....	54
3.2.5.2.2. Determinación de la alanín-transaminasa (ALT).....	55
3.2.5.2.3. Determinación de γ -glutamilttransferasa (-GT).....	55
3.2.5.2.4. Determinación de fosfatase alcalina (PAL).....	55
3.2.5.2.5. Determinación de creatín-fosfoquinasa total (CPK).....	56
3.2.5.2.6. Determinación de lactato deshidrogenasa (LDH).....	56
3.2.5.3. Parámetros hematológicos.....	56
3.2.5.3.1 Determinación de hemoglobina.....	56
3.2.5.3.2 Determinación de hematócrito.....	56
3.2.5.3.3. Determinación del recuento eritrocitario (RBC) y de los índices eritrocitarios (VCM, HCM, CHCM).....	57
3.2.5.3.4. Determinación de la curva de fragilidad osmótica.....	58
3.2.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS HEPÁTICAS.....	59
3.2.6.1. Determinación de glucógeno y glucosa.....	59
3.2.7. ANÁLISIS DE MUESTRAS MUSCULARES.....	60
3.2.7.1. Análisis enzimáticos.....	60
3.2.7.1.1. Determinación de la enzima citrato sintasa (CS).....	60
3.2.7.1.2. Determinación de la enzima hexoquinasa (HK).....	61
3.2.7.1.3. Determinación de la enzima piruvato quinasa (PK).....	62
3.2.7.1.4. Determinación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	62

3.2.7.1.5. Determinación de la 3-hidroxi-Acil-CoA-deshidrogenasa (HAD).....	63
3.2.7.2. Análisis histológicos e histoquímicos.....	64
3.2.7.2.1. Obtención de los cortes musculares.....	64
3.2.7.2.2. Técnica de hematoxilina-eosina.....	64
3.2.7.2.3. Técnica de miosín-adenosín-trifosfatasa (ATPasa).....	65
3.2.7.2.4. Técnica de la nicotinamida-adenin-dinucleótido-tetrazólium-reductasa (N A D H T R).....	67
3.2.7.2.5. Técnica de la esterasa.....	68
3.2.7.2.6. Técnica de la inmunoperoxidasa indirecta.....	69
3.2.7.3. Estudio histoquímico, cuantitativo y morfométrico.....	71
3.2.7.3.1. Determinación de áreas y perímetros.....	71
3.2.7.3.2. Determinación del porcentaje fibrilar.....	71
3.2.7.3.3. Determinación de la capilaridad.....	71
3.2.7.3.4. Otras determinaciones.....	72
3.2.7.4. Tratamiento estadístico.....	72
3.2.7.5. Error metodológico.....	72
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	75
4.1 EVOLUCIÓN DEL PESO.....	75
4.2 CONSUMO DE ETANOL.....	76
4.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SANGRE.....	78
4.3.1. NIVELES DE GLUCOSA Y TRIGLICÉRIDOS.....	78
4.3.2. NIVELES DE PROTEÍNAS TOTALES Y UREA.....	80
4.4. PARÁMETROS ENZIMÁTICOS EN SANGRE.....	81
4.4.1. NIVELES DE TRANSAMINASAS.....	82
4.4.2. NIVEL DE CPK, LDH Y PAL.....	84
4.5. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.....	86
4.5.1. NIVELES DE HEMOGLOBINA, HEMATÓCRITO, RECUENTO E ÍNDICES ERITROCITARIOS.....	86
4.5.2. RECUENTO DE LEUCOCITOS.....	89
4.6. FRAGILIDAD OSMÓTICA.....	90
4.7. GLUCÓGENO HEPÁTICO.....	94
4.8. METABOLISMO ENERGÉTICO EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	94

4.8.1. PERFIL ENZIMÁTICO.....	95
4.8.1.1. Actividades enzimáticas musculares: efecto del ejercicio.....	96
4.8.1.2. Actividades enzimáticas musculares: efecto del etanol.....	97
4.8.1.3. actividades enzimáticas musculares: efecto del ejercicio y etanol.....	98
4.8.2. ESTUDIO DE CAPILARIDAD.	103
4.9. COMPOSICIÓN MIOTIPOLOGICA.....	109
4.10. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	110
5. CONCLUSIONES.....	121
6. BIBLIOGRAFÍA.....	123

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del peso corporal (g) en los distintos grupos a lo largo de los tres meses del experimento.....	76
Figura 2. Peso (g) medio de los animales en los distintos grupos al final del experimento.....	77
Figura 3. Consumo de etanol medio (ml/peso x 100) durante períodos de diez días en el grupo sedentario y en el grupo que realiza ejercicio a lo largo del experimento.....	78
Figura 4. Representación del porcentaje de hemólisis (H) frente a la concentración mM de NaCl, al final del primer mes del estudio.....	92
Figura 5. Distribución eritrocitaria a partir de la fragilidad osmótica. Representación de la variación en el porcentaje de hemólisis (H) con respecto a la concentración de NaCl (mM) (X) en función de la concentración NaCl (mM) al final del primer mes de tratamiento.....	92
Figura 6. Distribución eritrocitaria a partir de la fragilidad osmótica. Representación de la variación en el porcentaje de hemólisis (H) con respecto a la concentración de NaCl (mM) (X) en función de la concentración NaCl (mM) durante los tres meses de tratamiento del grupo entrenado.....	93
Figura 7. Distribución eritrocitaria a partir de la fragilidad osmótica. Representación de la variación en el porcentaje de hemólisis (H) con respecto a la concentración de NaCl (mM) (X) en función de la concentración NaCl (mM) durante los tres meses de tratamiento del grupo que realiza ejercicio y recibe etanol.....	93
Figura 8. Niveles medios y DS de glucógeno hepático (mg/g de hígado), en los grupos estudiados, al final del experimento.	94
Figura 9. Valores medios y DS de las actividades enzimáticas musculares ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{gramo}$ de peso) de la piruvato quinasa (a), lactato deshidrogenasa (b), citrato sintasa (c) y 3-Hidroxiacil-CoenzimaA-deshidrogenasa (d) en plantaris (Pl.), gastrocnemio blanco (G. B.), sóleo (S.) y gastrocnemio rojo (G.R.).....	100
Figura 10. Actividad enzimática de la Hexoquinasa en los distintos músculos y porciones musculares estudiadas	102
Figura 11. Efecto del etanol en el área de los distintos tipos de fibras en el plantaris. a) grupos control y etanol, b) grupos ejercicio y etanol ejercicios.....	114
Figura 12. Efecto del etanol en el área de las fibras de tipo I en los músculos sóleo, gastrocnemio rojo y gastrocnemio mixto.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Pesos de los animales (g), hígado y los distintos músculos estudiados (g/peso total x 1.000) ± DS al final del experimento.....	77
Tabla II. Niveles medios y desviaciones estándar (DS) de glucosa triglicéridos (mg/dl) a lo largo del experimento.....	80
Tabla III. Valores medios y las correspondientes desviaciones estándar de proteínas totales (g/dl) y de urea (mg/dl) en el suero de los animales durante el primer, segundo y tercer mes del experimento.....	81
Tabla IV. Niveles medios (U/l) y DS de las actividades alanín-transferasa (ALT), aspartato-transferasa (AST) y -glutamil transferasa (-GT).....	84
Tabla V. Valores medios (U/l) y las correspondientes DS de las actividades creatín-fosfoquinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatase alcalina (PAL) en suero.....	86
Tabla VI. Valores medios y DS de hemoglobina (g/dl), hematócrito (ml de eritrocitos/dl de sangre) y RBC (recuento eritrocitario en millones/mm ³) a lo largo del experimento.....	88
Tabla VII. Valores medios ± DS de los índices eritrocitarios al final del primer, segundo y tercer mes del estudio.....	89
Tabla VIII. Valores medios y DS de los leucocitos (número de células/mm ³) y linfocitos (%)......	90
Tabla IX. Parámetros relacionados con la hemólisis hipotónica.....	91
Tabla X. Actividad de la Citrato sintasa (pmol/min.gramo de peso) ± DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.....	101
Tabla XI. Actividad de la -Hidroxiacil-CoenzimaA-Deshidrogenasa (HAD) (μmol/min.gramo de peso) ± DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.....	101
Tabla XII. Actividad de la Hexoquinasa (HK) (μmol/min.gramo de peso) ± DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.....	101
Tabla XIII. Actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH) (μmol/min.gramo de peso) ± DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.....	102
Tabla XIV. Actividad de la Piruvato quinasa (PK) (μmol/min.gramo de peso) ± DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.....	103
Tabla XV. Valor medio y DS del número de capilares por fibra (C/F) y de la densidad capilar (C/mm ²) en los distintos músculos y tratamientos.....	105
Tabla XVI. Valores medios y DS de la distribución en porcentaje (%) de los distintos tipos fibrilares en el gastrocnemio rojo y mixto. El porcentaje se ha obtenido mediante recuento directo en preparaciones teñidas con la técnica ATPasa pH 4,6...	109

Tabla XVII. Valores medios y DS de la distribución en porcentaje (%) de los distintos tipos fibrilares en el plantaris y sóleo. El porcentaje se ha obtenido mediante recuento directo en preparaciones teñidas con la técnica ATPasa pH 4,6.....	109
Tabla XVIII. En la tabla se recogen los valores medios y las desviaciones estándar de los porcentajes de los tipos fibrilares obtenidos a través de la técnica NADH-TR, en la porción blanca del Gastrocnemio y en el plantaris	110
Tabla XIX. Valores de área en μm^2 y perímetro en μm con las desviaciones estándar correspondientes (DS) correspondientes a las fibras de tipo I en el sóleo y las tipo IIB del gastrocnemio blanco. Ambos tipos de fibras se consideran como los únicos que existen en los citados músculos.....	113
Tabla XX. Valores medios de área en μm^2 y perímetro en μm con las desviaciones estándar correspondientes (DS) de los distintos tipos de fibras en el plantaris.....	113
Tabla XXI. Valores medios de área en μm^2 y perímetro en μm con las desviaciones estándar correspondientes (DS) de los tres tipos de fibras en el gastrocnemio rojo, en los distintos grupos estudiados.....	115
Tabla XXII. Valores medios de área en μm^2 y perímetro en μm con las desviaciones estándar correspondientes (DS) de los tres tipos de fibras en el gastrocnemio mixto, en los distintos grupos estudiados.....	116

ÍNDICE DE LÁMINAS

- LÁMINA 1.** Corte transversal de la pata posterior de la rata. A Plantaris (ATPasa, pH 4,6). B. Sóleo y Gastrocnemio rojo (ATPasa, pH 4,4). C. Gastrocnemio blanco (NADH-TR). D. Gastrocnemio mixto (Esterasa).....18
- LÁMINA 2.** Fotografías correspondientes al sóleo (a) y gastrocnemio blanco (b), en las que se visualizan los capilares mediante la técnica ATPasa, pH 4,0.....106
- LÁMINA 3.** Fotografías correspondientes al músculo sóleo (x200). Los cortes que se visualizan están realizados mediante las tinciones ATPasa pH 4,6; (a), NADH-TR (b) y Esterasa (c). La homogeneidad de la composición fibrilar del sóleo (fibras tipo I) se manifiesta en estas fotografías.117
- LÁMINA 4.** Fotografías correspondientes al músculo plantaris (x200). Los cortes que se visualizan están realizados mediante las tinciones: ATPasa pH 4,6 que discrimina las fibras de tipo I (fuertemente teñidas), IIA (claras) y IIB (intermedias) (a), NADH-TR, con esta tinción las fibras glucolíticas aparecen poco teñidas frente a las fibras oxidativas fuertemente teñidas (b) y Esterasa. Tinción relacionada con el contenido lipídico de las fibras (c).....118
- LÁMINA 5.** Fotografías correspondientes al gastrocnemio blanco (x200). Los cortes que se visualizan están realizados mediante las tinciones ATPasa pH 4,6 (las fibras que se observan son las IIB) (a), NADH-TR (b). con esta tinción se evidencia la capacidad oxidativa de algunas de las fibras de tipo IIB en la rata.....119
- LÁMINA 6.** Fotografías correspondientes al gastrocnemio rojo (x200). Los cortes que se visualizan están realizados con las técnicas ATPasa pH 4,5 (a) e inmunoperoxidasa con antimiosina rápida (b). La técnica inmunohistoquímica muestra fibras de tipo I (claras) que se corresponden en la técnica histoquímica con las fibras intensamente teñidas.....120

1. Introducción

El gran fisiólogo Claude Bernard, precursor de la medicina experimental, era totalmente abstemio, y estaba muy preocupado y molesto por la afición que tenía a la bebida uno de sus ayudantes, un excelente colaborador, encargado de la mayoría de los aspectos químicos de las investigaciones de su laboratorio. A pesar de la insistencia de Claude Bernard en que dejara de beber, su ayudante no le hacía caso. Un día, dispuesto a convencerle, le administró a un perro una cantidad de bebida alcohólica y pasado un tiempo le enseñó a su colaborador el aspecto hiperémico e irritado de la mucosa estomacal del animal. “¿Ve usted como beber alcohol no es bueno?”, le dijo Claude Bernard, a lo que su ayudante replicó: “lo que este experimento demuestra es que el coñac no fue hecho para perros”.

La acción del alcohol sobre los sistemas corporales es compleja, y son numerosos los problemas asociados a su consumo excesivo y frecuente. Se ha descrito que afecta a: cerebro, nervios, corazón, aparato digestivo, hígado, músculo esquelético y sangre, y que es capaz de producir numerosas alteraciones metabólicas directamente o indirectamente a través de los productos formados en su biotransformación. El estudio del consumo de alcohol y la realización de ejercicio se circunscribe normalmente al ámbito de “drogas y ejercicio”, incluyéndose dentro del apartado de sustancias que alteran o que interfieren con el normal desarrollo del ejercicio. Los aspectos más estudiados y que influyen en la actividad física son: el déficit vitamínico provocado por el alcohol y la acumulación de lactato que bloquea la secreción de ácido úrico.

Dentro de las acciones específicas del alcohol en los músculos cabe destacar que reduce de forma importante el aporte de glucosa y aminoácidos. La hipoglucemia generada puede provocar fallos en el suministro de energía e interferir en el metabolismo muscular en situación de ejercicio físico. De hecho, la miopatía “alcohólica” se describe normalmente en músculos glucolíticos, en los que existen deficiencias en el recambio proteico y el metabolismo de la glucosa, asociados al consumo crónico de alcohol.

Por otra parte el entrenamiento intenso y prolongado, se ha demostrado que induce diversos tipos de adaptaciones en el músculo esquelético, adaptaciones que incluyen cambios substanciales de diversas actividades enzimáticas. Tales cambios pueden ser consecuencia de una mayor concentración de las enzimas, o de un aumento en sus actividades específicas. El ejercicio físico aumenta el transporte de glucosa al músculo y se ha demostrado que la expresión de los transportadores para la glucosa en esta situación puede regularse de forma paralela a la de varias actividades enzimáticas musculares.

En determinadas condiciones, el ejercicio aumenta la síntesis de proteínas musculares desarrollándose la denominada “hipertrofia muscular”.

Los efectos del alcohol y del ejercicio en músculo son bastante antagónicos y su acción conjunta puede potenciar los efectos individuales o disminuirlos.

La mayoría de los músculos esqueléticos estudiados en las especies de mamíferos para dilucidar tanto las adaptaciones al entrenamiento de resistencia como los efectos del alcohol, consisten en una mezcla de los tres tipos de fibras: lentas o de tipo I y rápidas (IIA y IIB). Las ratas han sido el animal en el que más intensamente se ha estudiado la respuesta al ejercicio. Las fibras de tipo I en la rata se caracterizan por capacidades respiratoria, glucogenolítica y glucolítica moderadamente altas, baja actividad miosín-adenín-trifosfatasa (ATPasa) siendo resistentes a la fatiga. Las fibras de tipo IIA tienen la mayor capacidad respiratoria, glucogenolítica y glucolítica con actividad ATPasa elevada pero se fatigan rápidamente. Las fibras de tipo IIB, poseen baja capacidad respiratoria y presentan las mayores capacidades para el metabolismo glucolítico y la velocidad de contracción, aunque se fatigan también rápidamente.

En la lámina I se esquematiza un corte transversal de la parte posterior de la pata de la rata, en el que se han señalado distintas zonas musculares. Las fotografías muestran la composición fibrilar correspondiente a cada zona del músculo.

En general las adaptaciones mitocondriales al ejercicio o la génesis de miopatías por el alcohol tienen las mismas consecuencias fisiológicas en ratas y humanos, aunque es evidente que la información obtenida es específica de los músculos de roedores y no es siempre aplicable al músculo humano.

Objetivos

Con estos antecedentes se plantea el estudio del efecto del consumo crónico de etanol y del entrenamiento aeróbico, así como la interacción de ambos factores en ratas jóvenes. Las acciones se centrarán en el músculo esquelético, y para ello se estudiará:

- El metabolismo muscular a través de diversas actividades enzimáticas tanto oxidativas como glucolíticas.
- La distribución miofibrilar en los músculos elegidos.
- La morfometría de las fibras en las zonas musculares seleccionadas.
- El estudio debe incluir la cuantificación de enzimas séricas que actúen como marcadores del grado de alcoholización y de las miopatías.

Las posibles carencias nutricionales y el estado inmunológico serán evaluadas por el peso de los animales a lo largo del periodo experimental y mediante análisis de sangre.

Dentro del estudio se incluye así mismo, la resistencia eritrocitaria a la hemólisis hipotónica en las distintas condiciones experimentales.

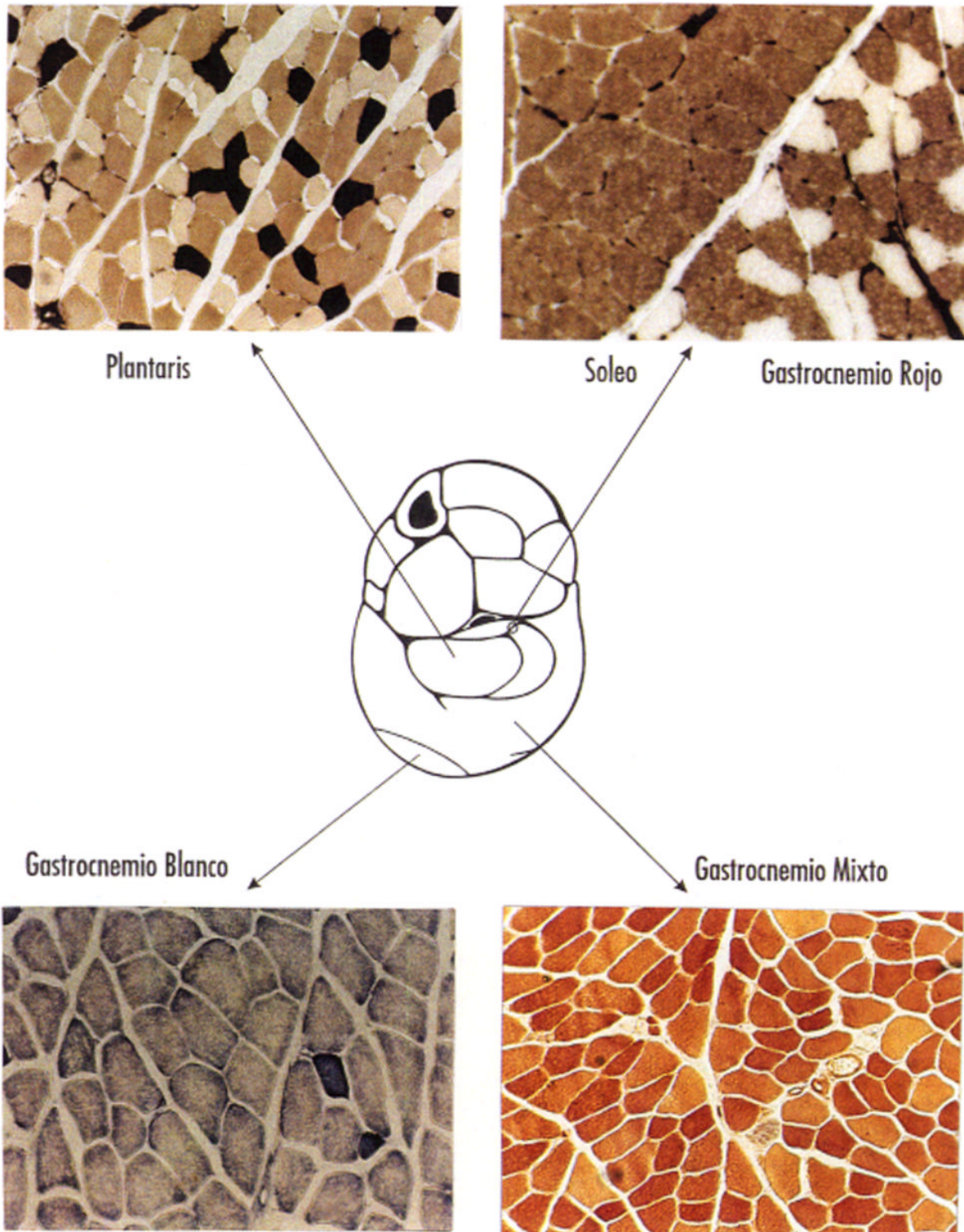


LÁMINA 1 Corte transversal de la pata posterior de la rata. A Plantaris (ATPasa, pH 4,6). **B.** Sóleo y Gastrocnemio Rojo (ATPasa, pH 4,4). **C.** Gastrocnemio Blanco (NADH-TR). **D.**Gastrocnemio Mixto (Esterasa).

2. Antecedentes bibliográficos

2.1. Fibras musculares

2.1.1. Identificación de los tipos fibrilares

En 1873, Ranvier fue el primero que relacionó la distinta tonalidad de los haces musculares con la velocidad de contracción, estableciendo la existencia de fibras rojas de contracción lenta y fibras blancas de contracción rápida (Peter y cols., 1972). Posteriormente Paukul en 1904 (citado por Hoppeler y cols., 1981), concluye que todos los músculos de contracción lenta son rojos pero que algunos músculos rojos son de contracción rápida. Propone que una velocidad de contracción intermedia es debida a que los músculos están formados por una mezcla de fibras rápidas y lentas. Denny-Brown (1929) y más tarde Aberle y cols., (1976), fueron los que catalogaron a las fibras rojas y blancas como fibras de contracción lenta (ST-slow twitch) y de contracción rápida (FT-fast twitch), respectivamente.

En los años 50 es cuando se produce un verdadero desarrollo del conocimiento de la célula muscular asociado al empleo de los métodos histoquímicos; así, Seligman y Rutemburg (1951) demuestran actividad succinico-deshidrogenasa tisular y Padykula y Herman (1955 a,b) diseñan la técnica miosín adenosín trifosfatasa miofibrilar (m-ATPasa). El uso de estas técnicas ha permitido la diferenciación de los tipos de fibras musculares.

Otra clasificación muy aceptada es la que propone Engel (1962), que clasifica las fibras en tipo I o en tipo II según su actividad miosín ATPasa sea baja o alta respectivamente. Esta orientación es seguida también por diversos investigadores: Padykula y Gauthier (1963), Dubowitz (1965), Gauthier y Padykula (1965), Gauthier (1967), Barany (1967), Guth y Samaha (1969) y Cassens (1970), entre otros. En 1969, Guth y Samaha demuestran que la miosina del músculo lento es más alcalino lábil y ácido estable que la del rápido. Esto lleva a

preincubar los músculos en medios alcalinos y ácidos, estableciéndose como valores preferenciales de pH a los comprendidos entre 9,4-9,6 y 4,2-4,5.

Gracias al empleo de estas técnicas, Brooke y Kaiser (1970), mediante preincubación en medio ácido, y utilizando la reacción miosín-ATPasa, clasifican a las fibras musculares, tanto en rata como en hombre, en fibras de tipo I y II, estableciéndose tres subtipos dentro de las fibras de tipo II: IIA, IIB y IIC. Estas técnicas son utilizadas en la mayoría de los trabajos posteriores.

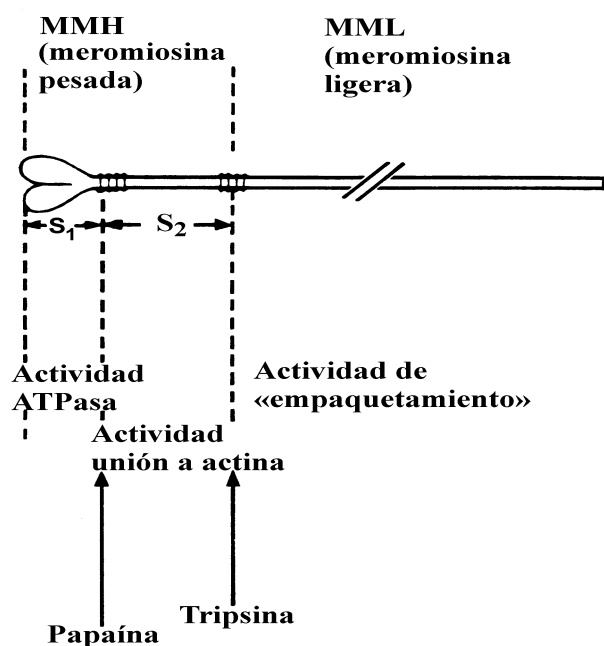
Posteriormente Soukup y cols., (1979) observaron que las fibras de contracción rápida (tipo II) muestran alta actividad ATPásica en un rango de pH comprendido entre 4,9 y 10,4, mientras que las de contracción lenta (tipo I) presentan su mayor actividad en un rango de pH entre 4,3 y 4,5.

El principio de la técnica miosín ATPasa, reside en la unión del fosfato inorgánico (Pi), liberado tras la hidrólisis del ATP, a algún componente muscular. Este Pi precipita como sal de calcio intercambiándose por cobalto, y este a su vez es convertido en sulfuro de cobalto al tratarlo con sulfuro de amonio. Al final las fibras aparecen respectivamente desde negras a blancas según sea la cantidad de cobalto fijado (Gollnick y Hodgson, 1986).

Gollnick y cols., (1983) clasifican las fibras de tipo II al ir disminuyendo su actividad a la vez que bajaba el pH del medio de preincubación. Estas fibras identificadas como IIA1, IIA2 y IIA3, no equivalen a las fibras IIA, IIB y IIC descritas por Brooke y Kaiser, (1970). Por su parte Matoba y Gollnick (1984), señalan que además del pH, la composición iónica del buffer usado en la preincubación influye o no en la activación de la miosín ATPasa.

Por otra parte, esta información se completa con estudios inmunohistoquímicos que han sugerido una correlación entre la tinción por m-ATPasa y el tipo de miosina presente en la fibra muscular. Estas técnicas se han desarrollado por medio del microscopio electrónico y de fluorescencia (Pepe, 1983) y son muy utilizadas para el estudio de las diferencias entre las fibras musculares, (Gautier, 1979 y 1980; Lowey, 1980; Pierobon-Bormioli y cols., 1981). A este respecto, Billeter y cols., (1980) muestran una evidente correlación entre los tipos de fibras y el tipo de miosina rápida o lenta, en músculo esquelético humano y también que la tonalidad de tinción mediante la técnica miosín-ATPasa, esta determinada por la secuencia peptídica presente en el inicio de las cadenas pesadas de miosina.

En el siguiente esquema podemos ver la ultraestructura de los filamentos gruesos constituidos por miosina:



Así, las fibras de tipo I y II son claramente diferentes en los fragmentos peptídicos de sus cadenas pesadas de meromiosina, mientras que las fibras de tipo IIA y IIB difieren en menor grado en sus mapas peptídicos, siendo las cadenas ligeras las que son distintas dentro de las fibras tipo II. En cuanto a las fibras IIC, poseen una intensidad de tonalidad de tinción variable mediante la técnica de miosín-ATPasa, pudiendo dividirse esta población fibrilar en los subtipos IC y IIC, indicando las diferentes proporciones de cadenas pesadas lenta o de tipo I y rápida o de tipo II que poseen (Staron y Pette, 1986). Existen además las fibras tipo IIAB descritas por Snow (1983), con una tonalidad intermedia entre los tipos IIA y IIB, probablemente posean un patrón de isomiosina intermedio entre los tipos IIA y IIB, tal como apuntan Pierobon-Bormioli y cols., (1981) mediante procedimientos inmunohistoquímicos.

La ventaja de estos métodos es su gran sensibilidad y que actúan directamente sobre proteínas o regiones de proteínas. Con el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos este método será el ideal para la identificación de diferencias y semejanzas entre los distintos tipos de fibras musculares. El problema de estas técnicas radica en la obtención del antígeno para realizar la técnica inmune, sin embargo es solo cuestión de tiempo que estas técnicas se impongan como de rutina en estudios musculares.

Paralelamente a estos estudios, se realizan otras investigaciones que tratan de correlacionar las actividades metabólicas (oxidativa y glucolítica) con la actividad ATPasa. En esta línea destacan los trabajos de Stein y Padykula, (1962); Henneman y Olson, (1965); Edgerton y cols., (1969); Gillespie y cols., (1970) Barnard y cols., (1971); Edgerton y Simpson, (1971). Una observación debemos tener en cuenta a este respecto, y es que no todas las fibras oxidativas son de contracción lenta (Barnard y cols., 1970; Peter y cols., 1972).

Pero son definitivamente Peter y cols., (1972) quienes orientan las bases de una nueva clasificación fibrilar, denominando a los tres tipos de fibras propuestas por Stein y Padykula, (1962) como fibras SO (de contracción lenta y metabolismo oxidativo), fibras FOG (de contracción rápida y metabolismo oxidativo-glucolítico) y fibras FG (de contracción rápida y metabolismo glucolítico), respectivamente. Burke y cols., (1971) establecen una denominación diferente, agrupando las distintas unidades motoras y dividiéndolas en SR (lentas resistentes), FR (rápidas resistentes) y FF (rápidas fatigables).

En la siguiente tabla se puede ver un resumen de la distinta terminología utilizada en la identificación de los tipos de fibras así como los distintos métodos empleados en cada caso en los inicios del estudio del tipo de fibra muscular:

Referencia	Método	Tipo fibra		
Ranvier (1873).	Histológico y fisiológico.	Rojas lentas	Blancas rápidas	Blancas rápidas
Dubowitz y Pearse (1960). Engel (1962).	Enzimas oxidativas, fosforilasa.	I	II	II
Stein y Padykula (1962).	Distribución mitocondrial, ATPasa.	B	C	A
Romanul (1964).	Perfil histoquímico.	III	II	I
Padykula y Gauthier (1967).	Distribución mitocondrial.	Intermedio	Rojo	Blanco
Brooke y Kaiser (1970).	Enzimas oxidativas, ATPasa.	I	IIA	IIB
Yellin y Guth (1970).	Enzimas oxidativas, ATPasa.			
Ashamore y Doerr (1971).	Enzimas oxidativas, ATPasa.	-rojo	-rojo	-blanco
Burke y cols., (1971).	Fisiol. e Histoq. unidad motora	S	FR	FF
Peter y cols., (1972).	Fisiol. Histoq. y Bioq. en musc. homogenado.	SO	FOG	FG

A partir de esta época, los estudios se encaminan a discutir aspectos que afectan a la investigación fibrilar en base al esclarecimiento bioquímico y estructural de algunos de los componentes inmersos en el proceso de la contracción muscular, y tratan de visualizar en una misma sección muscular los tres tipos de fibras anteriormente descritos.

En este sentido Tunell y Hart, (1977) identifican en la misma sección de músculo esquelético humano las fibras tipo I, IIA y IIB, basándose en la intensidad de color tras preincubación en una solución de formaldehído, glicina y calcio a pH 7,25 y posterior incubación en solución acuosa de ATP a 37 °C en presencia de calcio. De esta forma las fibras tipo I no aparecen teñidas, debido a la alta inhibición de la

actividad ATPasa, las IIA muestran tinción intermedia por la moderada inhibición, y las IIB, oscuras, al no estar inhibida la ATPasa.

Posteriormente Doriguzzi y cols., (1983) identifican tres tipos de fibras en una misma sección de músculo esquelético humano, mediante tinción con sales catiónicas tras preincubación a pH 4,5 y posterior incubación a pH 9,4 en presencia de calcio y ATP. Aunque esta técnica superó a la aportada por Tunell y Hart (1977), los colores de las fibras eran distintos sólo en un corto periodo de tiempo, y ninguna de las dos permitía visualizar las fibras IIC.

Basándose en la técnica anterior y con el fin de ampliarla para visualizar las fibras tipo IIC, Ogilvie y Feedback, (1990) logran identificar en una sola muestra las fibras I, IIA, IIB y IIC en músculo esquelético humano preincubando a pH 4,5 e incubando con ATP a temperatura ambiente. Las fibras se diferencian al ser teñidas con azul de toluidina, apareciendo las fibras tipo I turquesa, IIA violeta, IIB rosa claro y IIC azul oscuro.

En cuanto a su denominación, McConathy y cols., (1983) comparan la relación entre estructura y función tratando de establecer una equivalencia entre las diversas nomenclaturas empleadas para describir a las fibras musculares, clasificándolas en fibras de tipo I (fibras SR ó SO), fibras tipo IIA (FR ó FOG) y fibras IIB (FF ó FG).

Con las técnicas de identificación puestas a punto y su nomenclatura aceptada, no podemos dejar de comentar que los avances más sorprendentes sobre la identificación fibrilar en los últimos años se encuentran por una parte en la introducción de la preincubación de cobre (Gollnick y cols., 1983; Gollnick y Matoba, 1984; Matoba y cols., 1985) y por otra en la comprobación inmunológica de la miosina muscular mediante anticuerpos específicos (Gröschel-Stewart y cols., 1973; Arndt y Pepe, 1975; Gauthier y Lowey, 1977 y 1979; Lutz y cols., 1979; Billeter y cols., 1980; Pierobon-Bormioli y cols., 1981; Staron y Pette, 1986; Schiaffino y cols., 1988; Gorza, 1990).

2.1.2. Características de los tipos de fibras musculares

El comportamiento funcional del conjunto de músculos corporales es heterogéneo. Los músculos posturales, están implicados en las situaciones que obligan a mantener una actividad contráctil moderada durante periodos prolongados, mientras que en otros casos la situación es inversa: los músculos se ven obligados a vencer resistencias importantes por periodos de tiempo pequeños y a alta velocidad de contracción. Muchos músculos presentan características intermedias, por lo que participan en mayor o menor medida en ambos tipos de actividad. Por estos motivos existen grandes diferencias entre los distintos músculos, que son

expresión de la distinta constitución histológica así como de las propiedades contráctiles y metabólicas de sus fibras constituyentes.

Así, la distribución heterogénea que presentan los músculos locomotores de los mamíferos hace que estén provistos de sistemas y estructuras metabólicas que minimizan el coste energético de la locomoción produciéndose, por consiguiente, un estrecho acoplamiento entre estructura y función para cada diferente requerimiento (Goldspink, 1977).

La mayoría de las actividades enzimáticas varían ampliamente, no sólo entre especies (Reichmann y Pette, 1982), sino también entre fibras pertenecientes al mismo tipo histoquímico, lo que indica un amplio espectro en su perfil metabólico (Lowry y cols., 1978; Spamer y Pette, 1980; Pette, 1985; Pette y Spamer, 1986).

Morales (1989) propone la clasificación de los distintos tipos fibrilares en base únicamente a su actividad miosín-ATPasa, por ser esta la que verdaderamente se relaciona con la estructura molecular de las proteínas contráctiles, mostrando aparte el perfil metabólico ya que la regulación de ambas podría ser independiente (Pette, 1985). Además, diversos factores externos tales como el entrenamiento o la maduración, condicionan algunas adaptaciones bioquímicas en los tipos de fibras musculares, capaces de modificar sustancialmente su perfil metabólico (McMiken, 1986).

De este modo podemos clasificar las fibras musculares en los siguientes tipos:

Fibras de tipo I

Son fibras de contracción lenta, poseen una actividad ATPásica entre 2,5 y 3 veces menor que las fibras rápidas (Barany, 1967; Viitasalo y Komi, 1978), con gran capacidad oxidativa y baja capacidad glucolítica. Debido a ello poseen una elevada densidad mitocondrial, al tiempo que disponen de alto contenido mioglobínico (fibras rojas), y un rico abastecimiento capilar que facilita la difusión de oxígeno. Estas características explican su mayor resistencia a la fatiga y su alto rendimiento energético desde el metabolismo oxidativo utilizando sustratos exógenos principalmente glucosa y ácidos grasos libres de la sangre, pero también glucógeno y triglicéridos (Baldwin y cols., 1973; Saltin y cols., 1977; Gollnick y Saltin 1982; Essén-Gustavsson y cols., 1984; Abernethy y cols., 1990; David y Bassett, 1994). La escasa actividad de la enzima miosín ATPasa en las fibras tipo I las dota de menor capacidad para hidrolizar el ATP, de ahí la lentitud en el rendimiento energético de este tipo de fibra (McMiken, 1983).

Fibras de tipo II

Las fibras de tipo II ó de contracción rápida poseen gran capacidad glucolítica asociadas a la producción anaeróbica de ácido láctico, obteniendo pues la energía desde rutas

anaeróbicas, utilizando sustratos endógenos, principalmente glucógeno y triglicéridos. Tienen, por tanto, altos niveles de fuerza contráctil a elevada velocidad a costa de una más limitada capacidad de resistencia (Holloszy y Booth, 1976). Tres poblaciones diferentes de fibras se encuentran en este grupo: IIA, IIB, y IIC.

Las fibras **IIA** tienen propiedades de contracción rápida, acompañada de una buena capacidad oxidativa (Peter y cols., 1972; Essen-Gustavsson y Lindholm, 1985) abundante abastecimiento capilar y mioglobínico (Abernethy y cols., 1990; David y Bassett, 1994) y una densidad mitocondrial igual (McMiken, 1986) o superior (Hoppeler y cols., 1983) que las fibras de contracción lenta. Además, las fibras IIA contienen mayor cantidad de lípidos (Hultman, 1995) y una cantidad de glucógeno similar o quizás algo menor (Andreas y Spurgeon, 1986) que las fibras tipo IIB. Su capacidad de resistencia a la fatiga es mayor que la de las fibras IIB (Hultman, 1995).

Por su parte las fibras tipo **IIB** tienen un pobre abastecimiento capilar, poco contenido mioglobínico, reducida dotación mitocondrial y muy baja actividad de enzimas oxidativas; pero muy alta actividad de enzimas glucolíticas. Estas fibras poseen una rápida contracción y son capaces de generar gran fuerza muscular durante un corto periodo de tiempo, ya que poseen una limitada capacidad de resistencia a la fatiga (Van den Hoven y cols., 1985; Wilmore y Costill, 1994).

Por último el tipo fibrilar **IIC** posee una capacidad oxidativa intermedia entre el tipo I y el tipo II, así como una densidad de volumen mitocondrial ligeramente superior a la de las fibras tipo IIA. Son fibras que aparecen en mayor cantidad en mamíferos jóvenes, por lo que podría tratarse de células indiferenciadas que se encuentran en estadio de desarrollo. Debido a sus características se consideran fibras de transición entre las de tipo I y las de tipo II que pueden aumentar para permitir una adecuación del músculo ante nuevas necesidades

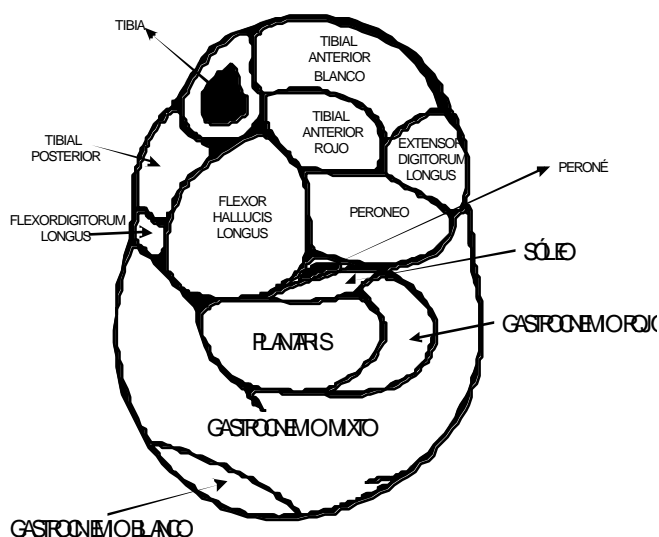
En el siguiente esquema podemos ver las distintas características de los tipos de fibras musculares:

Propiedad	I	IIA	IIB
Color	Rojo	Rojo	Blanco
Velocidad de contracción	Lenta (99-140 ms)	Rápida (48-88 ms)	Rápida (48-88 ms)
Actividad ATPasa	Baja	Alta	Alta
Actividad NADH-DH	Alta	Moderada	Baja
Actividad glucolítica	Baja	Alta	Alta
Actividad oxidativa	Alta	Alta	Baja
Fuente de ATP	Fosforilación oxidativa	Fosforilación oxidativa	Glucolisis
Red capilar	Abundante	Abundante	Escasa
Densidad mitocondrial	Alta	Moderada	Baja
Diámetro de la fibra	Pequeño	Intermedio	Grande
Resistencia a la fatiga	Alta	Media	Baja
Glucógeno	Bajo	Alto	Alto
Densidad lipídica	Alta	Media	Baja
Contenido en mioglobina	Alto	Alto	Bajo
Unión neuromuscular	Pequeña y simple	Intermedia	Grande y compleja

2.1.3. Población y tamaño fibrilar

Armstrong y Phelps (1984) nos mostraron marcadas diferencias entre los porcentajes y áreas fibrilares de treinta y dos músculos del **miembro pelviano** de la rata mediante técnicas histoquímicas de succinato-deshidrogenasa. En esta línea se encuentran entre otros los trabajos de Ariano y cols., (1973), Gunn (1978), Armstrong (1980), Elder y cols., (1982).

En todos estos trabajos se aprecian amplias diferencias respecto a los patrones de distribución fibrilar entre los músculos examinados. En general, dentro de la musculatura extensora del miembro pelviano, los músculos más profundos poseen una población de fibras tipo I relativamente mayor, mientras que los músculos más superficiales son primariamente rápidos (fibras tipo II); este patrón no es tan aparente en los músculos flexores. En general, los músculos torácicos muestran un mayor porcentaje de fibras tipo I que los pertenecientes al miembro pelviano. El porcentaje más bajo de fibras tipo II en los músculos torácicos, puede estar relacionado con su mayor capacidad propulsora (Guy y Snow, 1977a,b; Sullivan y Armstrong, 1978; Armstrong y Phelps, 1984).



Esquema de los músculos del corte transversal de la pata de una rata (Laughling y Armstrong, 1983).

Como puede deducirse, la mayor presencia de fibras tipo I está en correspondencia con la participación de los músculos íntegros o porciones de ellos en funciones estático-posturales, acción esta que a su vez exige una mejor condición de resistencia a la fatiga.

Los músculos del miembro pelviano de la rata se caracterizan por contener un alto porcentaje de fibras FG, lo que indicaría, hasta cierto punto, la vida sedentaria de estos animales, así como la gran especialización de sus músculos, encontrándose músculos con un gran predominio de fibras SO, como el músculo **Sóleo** o el **Vasto intermedio**, y otros músculos con un muy bajo o nulo porcentaje de este tipo fibrilar, como el músculo **Gastrocnemio** o el **Vasto lateral** (Baldwin y cols., 1972; Ariano y cols., 1973).

Igualmente el tamaño de un determinado tipo fibrilar varía al comparar distintos músculos, encontrándose una relación positiva entre el predominio de un tipo fibrilar dado y su tamaño fibrilar (Armstrong y Phelps, 1984), ya que esta característica se relaciona con la fuerza que las fibras musculares desarrollan (Burke, 1981; Saltin y Gollnick, 1983).

2.1.3.1. Diferencias dentro del músculo

En general, las fibras de contracción lenta son más numerosas en las regiones profundas y mediales, mientras que las fibras de tipo II predominan en las partes superficiales de los músculos y en la periferia de los fascículos (Gonyea y Ericson, 1976; Szentkuti y Cassens, 1978; Szentkuti y cols., 1981; Armstrong y cols., 1982; Rodríguez-Barbudo y cols., 1983; Kai, 1984; McMiken, 1986).

En los estudios realizados sobre ratas se ha encontrado que la estratigrafía de sus músculos es más extrema que en otros mamíferos (Armstrong, 1980 y 1981), lo que obliga, a la hora de analizar la población fibrilar de un músculo, a hablar de "porciones de músculo",

haciéndose necesario discriminar entre sus porciones blanca, mixta o roja, según el tipo de fibra predominante en cada una de ellas. Así por ejemplo en el músculo Gastrocnemio existe una zona medial profunda con predominio de fibras SO, una porción mixta que la rodea en la que se encuentran los tres tipos fibrilares básicos, y una amplia porción superficial en la que prácticamente sólo existen fibras tipo FG. Lo mismo podemos encontrar en el Vasto lateral y otros músculos (Bagby y cols., 1972; Baldwin y cols., 1972; Ariano y cols., 1973; Armstrong, 1980 y 1981; Burgos-Bretones y cols., 1980 y 1981; Armstrong y Phelps, 1984; Peña, 1984).

Esta estratigrafía fibrilar, afecta además al área de las fibras, mostrándose diferencias en el área de los tipos de fibras en función de la profundidad. Así, las fibras SO y FOG, localizadas preferentemente en las porciones musculares profundas (rojas) son, generalmente, de mayor tamaño que cuando se sitúan en las regiones superficiales (blancas) del mismo músculo; posiblemente debido a que estas fibras producen elevadas fuerzas continuas para conservar la postura (Burke, 1981; Rivero y cols., 1993). Al contrario ocurre con las fibras FG, las cuales son de mayor tamaño en las porciones más superficiales que en las profundas (Walmsley y cols., 1978; Armstrong y Phelps, 1984).

2.1.4. Factores que modifican la población y tamaño fibrilar

Existen distintos factores que influyen sobre las características fibrilares de los músculos. Factores **intrínsecos** como la edad, sexo, peso corporal y raza, entre otros, han sido investigados como causantes de variación en la población y tamaño fibrilar del músculo. También van a incidir otros factores **extrínsecos**, medioambientales, entre los que cabe destacar el entrenamiento físico como una causa importante de variaciones histoquímicas y morfométricas, de interés aplicativo en medicina deportiva.

2.1.4.1. Edad

La edad provoca variaciones tanto en la población como en el tamaño fibrilar de los músculos, principalmente en las fases de desarrollo y envejecimiento de los individuos (Goldspink, 1962; Larsson y cols., 1978; Poggi y cols., 1987; Lexel, 1993; Danieli-Betto y cols., 1995).

Respecto al número total de fibras presentes en un corte transversal completo de un músculo, se ha encontrado que alcanzan su valor máximo al nacimiento, o poco después, para permanecer constante a lo largo del desarrollo (Chiakulas y Pauly, 1965; Antonio y Gonyea, 1993). Por consiguiente el aumento del volumen muscular durante el desarrollo postnatal no depende del incremento de fibras musculares (hiperplasia), sino del incremento de tamaño (hipertrofia) de las fibras musculares ya presentes en el neonato (Rowe y Goldspink, 1969; Lieberman y cols., 1972; Saltin y cols., 1977; Ripoll y cols., 1979; Alnaqeeb y Goldspink,

1987). Esta hipertrofia se produce en mayor grado en determinados tipos fibrilares dependiendo de la específica actividad funcional del músculo (Rowe y Goldspink, 1969). En ratas albinas se ha encontrado que el aumento del tamaño de todas las fibras se produce hasta las doce semanas de vida, permaneciendo constante hasta las cien semanas (Alnaqeeb y Goldspink, 1987).

En cuanto al tamaño fibrilar, está aceptado que se produce un descenso en el área de las fibras tipo II al aumentar la edad, mientras que el área de las fibras tipo I no se ven afectadas (Lexel, 1993).

Las variaciones fundamentales de la población fibrilar durante el desarrollo no se producen tanto en la distribución de los tipos fibrilares contráctiles (ATPásicos), que se establecen en edades tempranas (Ashmore y cols., 1972; Gollnick y cols., 1973a), sino en la capacidad oxidativa de las fibras, que aumenta de forma progresiva, probablemente debido a la mayor sobrecarga corporal (Tauchi y cols., 1971; Kugelberg, 1976; Tamaki, 1985; Goldspink y Ward, 1979; Alnaqeeb y Goldspink, 1987). De esta manera, han sido múltiples los autores que han estudiado la conversión fibrilar hacia tipos más oxidativos como un fenómeno normal de maduración muscular (Eriksson y cols., 1973; Bass y cols., 1975; Kugelberg, 1976; Larsson y Edstrom 1986; Ansved y Larsson, 1989). Otros autores, sin embargo, no han evidenciado estos cambios (Essén-Gustavsson y Lindholm, 1985; Glenmark y cols., 1992).

Con la edad se va produciendo una disminución de los tipos fibrilares que menos predominan en un músculo, especializándose éste aún más en su función concreta (Gutman, 1976; Kugelberg, 1976; Goldspink y Ward, 1979), por lo que el patrón fibrilar final que va a poseer un músculo se producirá a la edad en la que se fijan sus necesidades funcionales (Kugelberg, 1976; Gutman, 1976; Adolfsson y cols., 1981).

2.1.4.2. Sexo y peso corporal

El factor sexual ha sido igualmente considerado como influyente en la determinación de las características histoquímicas y morfométricas de las células musculares.

La mayoría de los autores coinciden en que no existen diferencias en la distribución fibrilar de los músculos entre individuos de diferente sexo. Sin embargo, las fibras musculares de los individuos adultos machos son de mayor tamaño que las de las hembras (Costill y cols., 1976; Tamaki 1983; Peña 1984; Costerbosa y cols., 1987, entre otros). Estas diferencias se achacan a los efectos anabólicos de las hormonas sexuales masculinas (Gunn, 1978), si bien el nivel y tipo de actividad física, no pueden descartarse (Glenmark y cols., 1992).

Otro de los factores que influye sobre la población y el tamaño fibrilar del músculo son el peso y el tamaño corporal, los cuales están estrechamente relacionados con los efectos de la edad y el sexo.

Como ya hemos mencionado el aumento del peso y tamaño muscular se debe a una hipertrofia fibrilar (Chiaskulas y Pauly, 1965; Rowe y Goldspink, 1969; Lieberman y cols., 1972; Saltin y cols., 1977; Ripoll y cols., 1979; Alnaqeeb y Goldspink, 1987).

2.1.4.3. Efectos del ejercicio físico

El entrenamiento físico, repetición sistemática de una serie de gestos deportivos, ocasiona importantes modificaciones en el músculo, tanto a nivel estructural como a nivel metabólico, con el objetivo de mejorar el rendimiento. Los distintos tipos de entrenamientos provocan la contracción muscular, base de las modificaciones detectadas en los distintos tipos fibrilares. Para que esta contracción se realice, es preciso el continuado aporte de energía a la fibra.

Estas demandas energéticas de la fibra muscular, se atienden por la hidrólisis de enlaces fosfato de alta energía contenidos en el **ATP**, los cuales suministran unas 7.800 calorías por mol, en cada enlace hidrolizado. El ATP necesario para la contracción muscular va a proceder de distintas vías según la intensidad y duración de la contracción muscular. Estos sistemas metabólicos son: **1** Sistema fosfágenos, **2** Glucólisis anaerobia, **3** Fosforilación oxidativa, **4** Mioquinasa.

1- Sistema fosfágenos, que suministra energía en las primeras fases de la contracción recurriendo a los combustibles de utilización inmediata preexistentes: ATP y fosfocreatina (PC). Pueden ser utilizados de inmediato, sin necesidad de esperar a que se completen las vías oxidativas, tiene la función de ganar el tiempo necesario 2-5 segundos, para que continúe la contracción hasta que empiecen a completarse las vías metabólicas oxidativas.

2- Glucólisis anaerobia toma el relevo en el suministro de energía por su mayor velocidad de ejecución, con producción de lactato como producto final. En situaciones prolongadas deriva en una modificación del pH, produciendo un rendimiento mucho menor. Por ello si la fibra trabaja unos minutos en estas condiciones, aparece rápidamente la fatiga.

3- La tercera denominada fosforilación oxidativa se realiza en la mitocondria con aporte de oxígeno, se completa tras un periodo que se estima en alrededor de 1,5 minutos. Además de ser mucho más rentable energéticamente, ofrece la posibilidad de utilizar como sustratos glucosa o ácidos grasos.

4- Mioquinasa, vía, en caso de que las anteriores se encuentren agotadas o son insuficientes, puede generar ATP a través de ADP:



La demanda funcional que requiere el ejercicio físico obliga a la fibra muscular a una adaptación que se realiza principalmente a nivel bioquímico y estructural. La extrema plasticidad que caracteriza el músculo esquelético (Pette, 1980) capacita a sus fibras para sufrir las transformaciones estructurales, metabólicas y también en el plano de las proteínas contráctiles (Howal 1982; Howal y cols., 1985).

La magnitud de estas adaptaciones están relacionadas con el tipo de entrenamiento. Así, los programas de entrenamiento *de fuerza*, que inciden sobre grupos de músculos sometidos a ejercicios de alta intensidad y corta duración con un mayor componente de trabajo anaeróbico (Saubert IV y cols., 1973; Komi y cols., 1977; Jansson y cols., 1978; Roberts y cols., 1982), producen un aumento de la capacidad del músculo esquelético para producir fuerza. Un ejemplo de ello son los músculos hipertrofiados de los culturistas y levantadores de pesas. En contraste los programas de entrenamiento *de resistencia*, que utilizan ejercicios de menor intensidad y larga duración con fuerte componente aeróbico (Barnard y cols., 1970; Holloszy y Booth, 1976; Jansson y Kaiser, 1977; Green y cols., 1984; Peña, 1984; Essen-Gustavsson y Lindholm, 1985) inducen un incremento del consumo máximo de oxígeno sin modificar apreciablemente la fuerza del músculo (Megias y Saborido, 1989).

Las investigaciones sobre los efectos del entrenamiento, abordaron distintos mecanismos de adaptación: *fenómenos de hipertrofia-hiperplasia* (Edgerton, 1970; Reitsma, 1970; Gonyea y cols., 1977 y 1986; Gonyea, 1980 a y b; Ho y cols., 1980), *interconversión de los tipos fibrilares histoquímicos* (Faulkner y cols., 1971; Bagby y cols., 1972; Gollnick y cols., 1972; Maxwell y cols., 1973; Howald, 1982; Green y cols., 1984; Alnaqueeb y Goldspink, 1987) y *adaptación metabólica* (Barnard y cols., 1970; Gollnick y cols., 1970, 1972, 1973 a y b; Holloszy y Booth, 1976; Armstrong y Laughlin, 1983; Hoppeler, 1987).

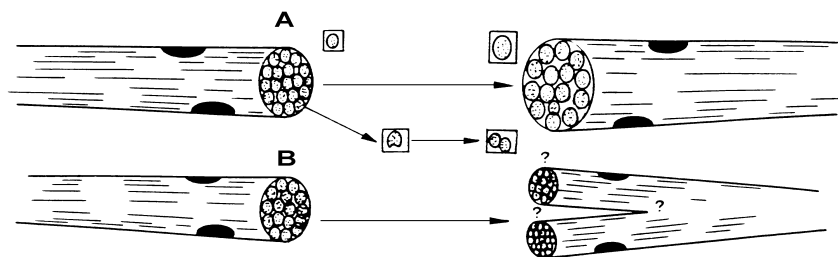
En la adaptación global del músculo intervienen además otros factores: los cambios en la densidad capilar (Carrow y cols., 1967; Mai y cols., 1970; Andersen, 1975; Andersen y Henriksson, 1977; Brodal y cols., 1977; Banchemo y cols., 1979; Adolfsson y cols., 1981; Hoppeler, 1987) y las variaciones en el tejido conjuntivo que rodea a los miocitos (Kovanen y cols., 1980). En cualquier caso, las variaciones que se producen en el tejido muscular tras el entrenamiento dependen fundamentalmente del músculo, del tipo de ejercicio al que es sometido (carrera, natación, sobrecarga

estática, etc.) y de la intensidad y/o duración del mismo. De esta forma podemos diferenciar dos regímenes de entrenamiento clásicamente denominados “de fuerza” y “de resistencia”.

2.1.4.3.1. Efecto sobre el tamaño fibrilar

Las modificaciones del tejido muscular debidas al ejercicio fueron descritas por primera vez por Morpurgo en 1897 (citado por Morales, 1989), al demostrar un aumento del área muscular total del músculo sartorio de perros sometidos a carrera, aumento que era consecuencia de una hipertrofia y no de hiperplasia. A partir de este estudio se aceptó que el ejercicio inducía hipertrofia muscular. Posteriormente, numerosos investigadores han realizado trabajos inductores de hipertrofia utilizando gran variedad de material y metodología (Müller, 1974; Gonyea y Ericson, 1976; Watt y cols., 1982; Häkkinen y cols., 1985; Tesch y Karlsson, 1986). Con la aparición conjunta de las técnicas morfométricas e histoquímicas, se comenzó a determinar y especificar la naturaleza de la hipertrofia muscular producida tras el entrenamiento, atribuyéndola por un lado a un fenómeno de aumento del número de células musculares, **hiperplasia** y, por otro, a un aumento del tamaño fibrilar, **hipertrofia**.

En cuanto a la hiperplasia es explicada por un fenómeno de división longitudinal dando dos o más fibras musculares hijas. Este fenómeno es conocido como “splitting” o escisión fibrilar y sería una respuesta adaptativa cuando las fibras alcanzan un volumen crítico, sobrepasado el cual se produciría una disminución en el suministro de oxígeno y metabolitos (Cullen y Mastaglia, 1982). Por su parte la hipertrofia, se muestra como un simple aumento del tamaño de la fibra muscular con cambios ultraestructurales consistentes en el aumento del número de miofibrillas y aumento del número y tamaño de las mitocondrias (Goldspink y Howells., 1974).



Carrow y cols., (1973) afirman que existe un aumento global de tamaño para los dos tipos fundamentales de fibras, aunque señala que el incremento es más significativo para las fibras rojas (tipo I), argumentando que estas son más dependientes del mecanismo neural. Posteriormente, Evarts (1979) demuestra que las primeras unidades motoras en ser estimuladas son las que inervan a las fibras de tipo I.

Cuando se señala una hipertrofia diferencial, los datos sobre qué fibra sufre esa hipertrofia son contradictorios. Para unos son las fibras de tipo IIA las que presentan un mayor grado de hipertrofia (Gonyea y Ericson, 1976; Watt y cols., 1982), mientras que otros autores encuentran mayor hipertrofia en las IIB y en menor grado en las IIA y I, siendo el aumento totalmente reversible (Goldspink y Ward, 1979). Parece ser que esta hipertrofia diferencial es debida a las condiciones experimentales, en particular por el tipo de ejercicio empleado. El entrenamiento de resistencia induciría una mayor hipertrofia de las fibras I (Prince y cols., 1977 y 1981; Melichna y cols., 1987), incluso acompañada de disminución de las fibras de tipo II (Gollnick y cols., 1973a). El entrenamiento de fuerza o velocidad, provoca una hipertrofia de las fibras de tipo II (Saltin y cols., 1976; Green y cols., 1979; Watt y cols., 1982; Häkkinen y cols., 1985).

También son numerosos los autores que no señalan hipertrofia de las células musculares en el ejercicio (Peter, 1971; Edgerton y cols., 1972; Holloszy y Booth, 1976; James y Cabric, 1981).

Esta ausencia de aumentos significativos en el tamaño fibrilar tras el entrenamiento está probablemente relacionada, con la naturaleza del entrenamiento realizado. El grado de hipertrofia depende igualmente de la intensidad y duración del ejercicio, edad de los animales, tipo de músculo analizado, etc. (Salmons y Henriksson, 1981). Para Walker (1966) la duración del ejercicio es más relevante que la intensidad del mismo, mientras que otros afirman que la hipertrofia muscular esta relacionada con la intensidad pero no con la duración del ejercicio (Mueller y Hettinger, 1953).

Los ejercicios de alta intensidad desembocan en una mayor capacidad contráctil de las fibras musculares, y un aumento del número total de miofibrillas (Jaweed y cols., 1974). En ejercicios prolongados se produce un incremento en la capacidad mitocondrial oxidativa (Holloszy y Booth, 1976); es decir, los ejercicios de resistencia requieren el aumento de los sistemas liberadores de energía, mientras que los ejercicios de intensidad requieren mayor capacidad en la síntesis de proteínas contráctiles.

Durante mucho tiempo se consideró que el aumento de la masa de un músculo se produce solamente mediante la hipertrofia de sus elementos, dada la naturaleza postmitótica del músculo estriado. Sin embargo, existen trabajos que señalan la posibilidad de que en el músculo se produzca un fenómeno de hiperplasia como respuesta adaptativa (Edgerton, 1970; Gollnick y cols., 1970; Gonyea y cols., 1977; Ho y cols., 1980; Gonyea y cols., 1986), lo que explicaría la ausencia de hipertrofia fibrilar en determinados tipos de ejercicio, pues las fibras de menor tamaño poseen una mayor actividad funcional, dado que en un mismo volumen intervienen un mayor número de unidades contráctiles (Essen-Gustavsson y Lindholm, 1985).

2.1.4.3.2. Efectos sobre las proteínas contráctiles

Las proteínas contráctiles se presentan como un conjunto de isoformas, cuyo perfil es modulado en función de los requerimientos del ejercicio.

La actividad mecánica es el principal desencadenante de estos cambios y desempeña un papel independiente al de la inervación, ya que el mismo tipo de adaptación puede observarse en músculos con características muy distintas en cuanto a su inervación, como son el músculo esquelético y el cardíaco (Risco, 1988).

Así como se han obtenido transformaciones de fibras tipo II a tipo I (Pette y cols., 1976; Buchegger y cols., 1984), con distintos modelos experimentales a través de estimulación directa de unidades motoras, no se han obtenido los mismos resultados con los métodos convencionales de entrenamiento (Gollnick y cols., 1973b; Taylor y cols., 1978; Hodgson y cols., 1986).

Sin embargo, estudios realizados en deportistas de distintas especialidades muestran grandes diferencias en la composición fibrilar en relación al ejercicio realizado. De hecho, un músculo asume una determinada función dependiendo de la proporción en que intervienen los diferentes tipos fibrilares y del área de sección transversal de cada una de ellas (Gunn, 1978; Snow y Guy, 1980), además, individualmente se producen distintos tipos de contracción muscular (Walton, 1981; Fox y Mathews, 1981), dado que en el aparato locomotor existen unidades funcionales dinámicas con cometidos tan dispares como aquellas encargadas del mantenimiento postural, frente a otras con acciones de rápida aceleración (Snow, 1983).

En este sentido Saltin y cols., (1977) observaron diferencias en vasto lateral de atletas sometidos a distintos entrenamientos, así en velocistas, la mayoría de las fibras son de tipo II, mientras que en corredores de fondo predominan las de tipo I y, en los de medio fondo, esta proporción es similar para ambos tipos fibrilares.

Estos datos plantearon el interrogante de si la población fibrilar era una característica genética, o si, el entrenamiento continuado provoca un fenómeno de especialización muscular al tipo de ejercicio (Essen, 1977; Komi y cols., 1977; Salmons y Henriksson, 1981; Szentkuti y Schlegel, 1985). No obstante otros trabajos contradicen lo anteriormente expuesto en cuanto los cambios en la composición fibrilar en humanos (Henriksson y Reitman., 1976). También hay que indicar que la composición fibrilar podría variar, además de con el entrenamiento, con el envejecimiento (Lexel, 1993; Danieli-Betto y cols., 1995).

Los mismos resultados se obtienen en trabajos con animales. En este sentido, entrenamientos moderados no producen variaciones en la actividad de la miosín-ATPasa (Bagby et al., 1972), mientras que entrenamientos más intensivos producen un incremento en las fibras lentas, tipo I (del 10 al 27%) en músculos rápidos, acompañado de un aumento de

las fibras IIA en detrimento de las IIB (Green y cols., 1983). Así mismo el contenido peptídico del retículo sarcoplásmico se transformó en el típico de las fibras lentas.

El entrenamiento de resistencia puede producir tipos de "fibras de transición" demostradas por análisis histoquímico de ATPasa miofibrilar (Green y cols., 1979; Pierodon-Bormioli y cols., 1981; Pette, 1984; Costerbosa y cols., 1987) e inmunohistoquímico (Schantz y cols., 1982), mediante las cuales era posible la transformación de las fibras de tipo II a tipo I en el músculo esquelético. Este fenómeno, sin embargo, no ha sido corroborado por otros autores (Bagby y cols., 1972; Gollnick y cols., 1973a; Henriksson y Reitman., 1976; Holloszy, 1976).

Jansson y cols., (1978), trabajando con hombres sometidos a programas de entrenamiento aeróbico y anaeróbico relativamente prolongado, concluyeron que las fibras de tipo IIC eran un tránsito hacia el tipo I o IIA, y estos autores proponen que todos los tipos fibrilares pueden provenir de otros de forma reversible, e irían en un sentido u otro según el tipo de trabajo realizado (aeróbico o anaeróbico), de la siguiente forma: IIB'IIAB'IIA'I. Los mismos resultados fueron obtenidos por otros autores (Pierodon-Bormioli y cols., 1981; Howald, 1982).

Costerbosa y cols., (1987) apuntan la posibilidad de que el aumento de fibras de tipo I tras el entrenamiento sea debido a la formación de nuevas fibras, ya sea por el fenómeno de "splitting" o escisión fibrilar o a partir de las células satélites, mas que interconversión fibrilar.

Se han descrito fenómenos de interconversión fibrilar entre los subtipos II ATPásicos. En el hombre, el entrenamiento de resistencia produce un incremento en la relación fibrilar IIA/IIB (Andersen y Henriksson, 1977; Jansson y Kaiser, 1977; Saltin y cols., 1977; Green y cols., 1979), al evidenciarse que los atletas de resistencia poseen muy pocas fibras de tipo IIB.

Este hecho está ampliamente aceptado tanto para el hombre como para los animales como una consecuencia del entrenamiento aeróbico (Green y cols., 1984). Primeramente se produciría un aumento de las fibras IIB, las cuales, una vez rebasada su capacidad, se transformarían en fibras de tipo IIA (Costerbosa y cols., 1987).

Por su parte Morales y cols., (1990), sometiendo a ratas a distintos protocolos de ejercicio, obtuvieron un aumento significativo de las fibras tipo IIA acompañado de una disminución paralela de las fibras IIB, que provocaría un aumento en la resistencia a la fatiga muscular. Al comparar el efecto de un mismo tipo de entrenamiento en músculos con distinta composición fibrilar, estos responden con distinta intensidad, dependiendo del protagonismo de cada uno de ellos en la realización del ejercicio al que es sometido.

2.1.4.3.3. Efecto sobre el perfil metabólico

Dado que en este apartado, veremos las variaciones a nivel metabólico, denominaremos a las fibras de tipo I como fibras SO (de contracción lenta y oxidativas), las IIA como FOG (de contracción rápida, oxidativas y glucolíticas) y las IIB como fibras FG (de contracción rápida y glucolíticas).

Los primeros estudios sobre el efecto del ejercicio físico sobre las enzimas oxidativas datan de los años 1939 y 1940, en los que Chepinoga (citado por Peña, 1984) demostró el aumento del 50 al 100% de la actividad succínico deshidrogenasa. A pesar de la relativa estabilidad de los tipos fibrilares a sufrir transformaciones en su estructura dependiendo del ejercicio, la capacidad adaptativa de la función metabólica del músculo esquelético es enorme (McMiken, 1986).

En las dos últimas décadas, han sido extensivamente estudiados los efectos del entrenamiento en el músculo esquelético (Gollnick y cols., 1973 a y b; Fitts y cols., 1975; Costill y cols., 1979; Holloszy y Coyle, 1984; Grinton y cols., 1992). Tanto el entrenamiento de resistencia como el ejercicio de alta intensidad, han mostrado un incremento en la capacidad oxidativa del músculo esquelético (Hollosz y Booth, 1976; Troup y cols., 1986). Esta adaptación contribuye al aumento de la capacidad de resistencia en animales entrenados y en el hombre.

Para que pueda existir una transformación de los tipos de fibras musculares debe ocurrir previamente una alteración fundamental a nivel de la organización metabólica, en la actividad enzimática mitocondrial del metabolismo oxidativo aeróbico y en la actividad enzimática glucolítica y glucogenolítica (Salmons, 1980; Salmons y Henriksson, 1981). A nivel de las fibras FG se han encontrado grandes aumentos de las enzimas del metabolismo aeróbico (Bass y cols., 1969) encontrándose también un aumento sustancial de la actividad mitocondrial oxidativa en fibras FOG (Holloszy y Booth, 1976).

Green y cols., (1983) encuentran en ratas sometidas a un entrenamiento de resistencia, un incremento de la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs, de la β -oxidación y de la utilización de las cetonas, tanto en la porción superficial como profunda del músculo vasto lateral, aunque con un incremento mayor en la porción superficial con fibras FG, al mismo tiempo que una disminución en las enzimas glucolíticas y glucogenolíticas aunque en menor grado en la porción profunda (fibras FOG). De este modo, las fibras FG llegan a tener un perfil metabólico similar a las FOG, y las FOG similar a las SO.

La mayoría de los autores coinciden en que el entrenamiento de resistencia provoca un aumento de la capacidad aeróbica del músculo, aumentando la actividad oxidativa de todos los tipos de fibras, haciendo más difícil la discriminación entre los tres tipos de fibras (SO, FOG, FG) encontrados mediante técnicas histoquímicas oxidativas (Holloszy, 1967; Edgerton

y cols., 1969; Laughlin y Armstrong., 1982; Green y cols., 1983; Peña, 1984; Hoppeler, 1987; Abernethy y cols., 1990). Con el entrenamiento, no sólo se produce un aumento de las enzimas oxidativas, (Howald, 1982; Snow, 1983; Idström y cols., 1986; Stull, 1986), sino también, un mayor control respiratorio, con un mejor grado de acoplamiento de la fosforilación oxidativa (Holloszy, 1967).

Existen sin embargo, trabajos con resultados negativos en cuanto a la variación de estos parámetros. Hearn y Wainio (1956) no encontraron cambios en la actividad succinato-deshidrogenasa en el músculo esquelético y cardíaco tras someter a los animales de experimentación a natación hasta la extenuación. Edgerton y cols., (1970) refieren una inactivación de la fosforilasa debido al ejercicio. Las diferencias entre los distintos trabajos, pueden deberse a los diferentes protocolos de ejercicio utilizados, así como a las variaciones genéticas de los animales utilizados.

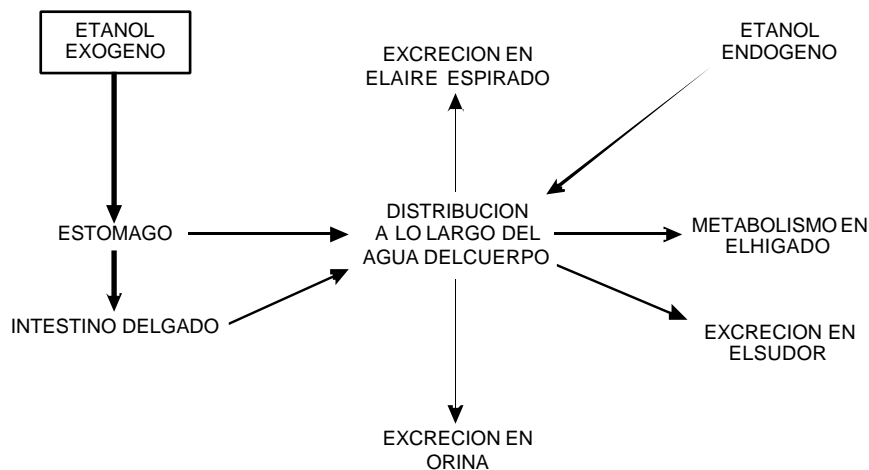
Kowalski y cols., (1969) observan un aumento de actividad fosforilasa y SDH en animales sometidos a carrera durante seis semanas. Gollnik y cols., (1973a) encuentran un aumento del potencial oxidativo en todos los tipos de fibras, mientras que la capacidad glucolítica se incrementa solamente en las fibras rápidas.

La densidad de lípidos es mayor en atletas entrenados para la carrera de resistencia que en individuos sedentarios (Hoppeler y cols., 1973). El entrenamiento de resistencia produce un aumento en los depósitos grasos así como una mayor cantidad de mitocondrias, situadas debajo del sarcolema, a expensas de las intermiofibrilares (Hoppeler y cols., 1975). Este hecho, junto con el hallazgo de mayor actividad de enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos, indicaría el mayor uso de este sustrato como combustible a consecuencia del entrenamiento (Holloszy y Booth, 1976; Saltin y Gollnick, 1983; Howald y cols., 1985). Por el contrario, en el entrenamiento de fuerza se produce una disminución.

2.2. Etanol

2.2.1. Absorción y metabolismo

En el siguiente esquema se muestra la absorción, excreción y metabolismo del etanol (Kricka y Clark, 1979):



2.2.1.1. Absorción

La absorción del etanol en el tracto gastrointestinal ha sido profusamente estudiada. El etanol ingerido se absorbe por un proceso de difusión simple rápidamente en el estómago (20%) y en la primera porción del intestino delgado (80%) especialmente en el duodeno. La velocidad de absorción del etanol varía considerablemente entre los individuos y depende de varios factores: concentración, tipo de bebida, velocidad de consumo, presencia de comida en el estómago, ejercicio físico, enfermedad, velocidad de vaciamiento gástrico y circulación enterohepática del etanol (Welling y cols., 1977; Beck y cols., 1979; Wilkinson, 1980).

El etanol absorbido se distribuye en todos los líquidos del organismo, tanto en el medio extracelular como en el intracelular. La concentración en los distintos tejidos es directamente proporcional a su contenido acuoso, e inversamente proporcional a su contenido en lípidos. En la mayoría de los tejidos la concentración de etanol es del 15-20% menor que en sangre puesto que su contenido acuoso es mayor.

Cuando las fases de absorción y distribución se completan, el nivel sanguíneo de alcohol comienza a descender de forma lineal (Crabb y cols., 1987). Está establecido que en concentraciones moderadas de etanol en sangre, la cinética de desaparición es de orden cero. Sin embargo estudios más detallados muestran que a ciertos niveles muy bajos la velocidad de eliminación esta catalizada enzimáticamente mostrando una cinética de desaparición saturable caracterizada por la ecuación de Michaelis-Menten (Lundsquist y Wolthers, 1958). Cuando las concentraciones de etanol son elevadas se produce un aumento en la velocidad de eliminación (Salaspuro y Lieber, 1978; Keiding y cols., 1983).

Todas estas observaciones se pueden ajustar a un modelo cinético de saturación que incluye una K_m que se activa a altas concentraciones de etanol, y un segundo proceso con una K_m relativamente baja para el etanol. Así, la conducta farmacocinética ha sido explicada por la existencia de dos enzimas capaces de metabolizar el etanol y que presentan afinidades altas y bajas lo que se traduciría en distintos valores de K_m .

Durante la oxidación del etanol, a concentraciones sanguíneas de 10 mM, el acetaldehído está presente a muy bajas concentraciones, menores de 2 mM, (Mizoi y cols., 1983), e indicaría que la eliminación de acetaldehído estará mediada por una enzima con una K_m muy baja. Se ha descrito en el hígado de mamíferos una Aldehído Deshidrogenasa (ALDH) mitocondrial con una K_m de aproximadamente $1\mu\text{M}$ para el acetaldehído.

Cuando se ha estimado en humanos la velocidad de eliminación de alcohol en sangre (Bennion y Li, 1976; Kopun y Propping, 1977; Keiding y cols., 1983), los resultados obtenidos muestran una gran variación entre individuos.

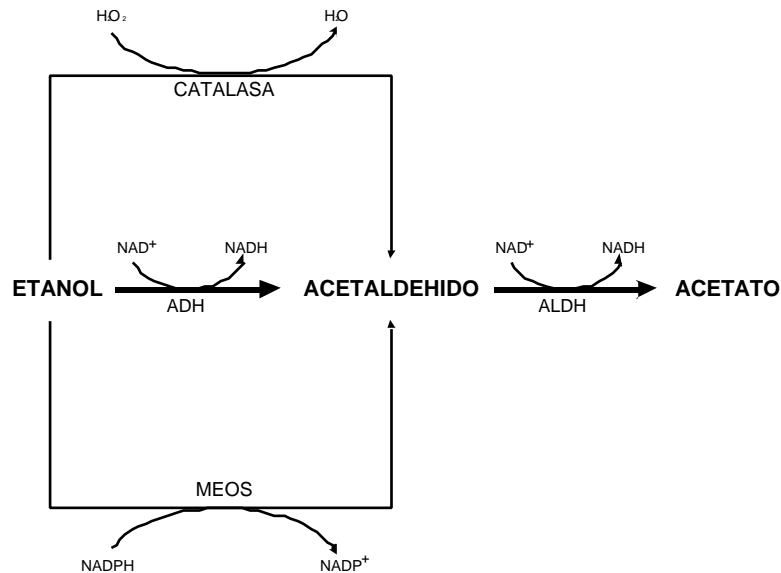
Cuando esta eliminación se mide en gemelos, aproximadamente la mitad de la variación que existe es debida a factores genéticos, y lo demás a factores ambientales (Martin, Perl y cols., 1985). Se considera que algunos de estos factores son el tabaco, el estado nutricional y el consumo habitual de alcohol, (Kopun y Propping, 1977).

2.2.1.2. Metabolismo

El etanol es metabolizado principalmente en el hígado (90%) aunque otros tejidos, como estómago, músculo, pulmón, riñón, intestino (Seitz y cols., 1978) y cerebro (Cohen y cols., 1983) pueden metabolizar el etanol en pequeñas cantidades. La fracción de etanol que no se metaboliza (2-10%) se excreta a través de orina, sudor y aire alveolar.

Tres sistemas enzimáticos, alojados en los hepatocitos, son capaces de metabolizar el etanol a acetaldehído:

- La Alcohol Deshidrogenasa (ADH) , localizada en el citosol.
- El Sistema Microsomal de Oxidación del Etanol (MEOS) en el retículo endoplásmico.
- El Sistema Catalasa-Oxidasa de Peroxisomas.



Alcohol Deshidrogenasa

La ADH esta presente esencialmente en el hígado, aunque se puede encontrar en otros tejidos (Li, 1977; Crabb y cols., 1979), esta enzima cataliza la oxidación del etanol a acetaldehído y la reducción de NAD^+ a NADH y H^+ , y es la responsable del 80-90% del metabolismo hepático del etanol cuando los niveles de este no alcanzan valores muy elevados.



Estructuralmente la enzima es un dímero formado por subunidades de 40 KDa conteniendo dos átomos de Cinc cada una. En humanos se distinguen tres clases de isoenzimas capaces de metabolizar el etanol: I, II, y III (Jörnvall y cols., 1987), en las que aparecen ocho tipos de subunidades distintas: α_1 , α_2 , α_3 , β_1 , β_2 , β_3 , γ_1 , y γ_2 . Recientemente se ha propuesto un modelo genético que atribuye esta multiplicidad de subunidades a la existencia de 5 loci (ADH1-ADH5) (Bosron y Li., 1987). El polimorfismo se daría en dos de ellos ADH2 y ADH3 que codifican para las subunidades α_2 y β_3 .

Las isoenzimas de la clase I están formadas por las subunidades α_1 y β_1 , siendo esta clase la que posee el valor de K_m más bajo para el etanol.

En la clase II siempre entra a formar parte la subunidad α_2 y posee una alta K_m . En la clase III la subunidad implicada es la β_3 que no participa en la oxidación del etanol debido a su baja afinidad por el sustrato.

El acetaldehído producido, a través de la ALDH pasa a acetato y el NADH genera un exceso de poder reductor que se almacena en el citosol cuando la cantidad de alcohol ingerido es alta. Tanto el acetaldehído como el NADH son los responsables de la mayoría de las lesiones celulares inducidas por el etanol, (Crabb y cols., 1979; Malka y cols., 1988).

Sistema microsomal de oxidación del etanol

La segunda ruta de oxidación es el sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS), este sistema interviene cuando la alcoholización es elevada o cuando existe una alcoholización crónica, su K_m para el etanol es 8-10 mM (más elevada que la ADH)

La oxidación se realiza por medio de una oxidasa localizada en el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos. La reacción es la siguiente:(Crabb y cols., 1979; Malka y cols., 1988).



En este sistema participa el citocromo P-450 (Ohnishi y Lieber, 1977). Varias formas isoenzimáticas del citocromo P-450 contribuyen a la oxidación del etanol (Lasker y cols., 1987a) de las cuales la forma inducida directamente por el etanol se conoce en la actualidad como P-450IIE1 (Nebert y cols., 1987) . El citocromo P-450IIE1 se purificó inicialmente en microsomas hepáticos de conejo (Koop y cols., 1982), también fue aislado en ratas tratadas con etanol (Ryan y cols., 1986), y en humanos (Lasker y cols., 1987b).

Catalasa

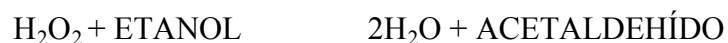
Una tercera ruta de oxidación se realiza por medio de la catalasa, que es un enzima localizada en los peroxisomas del hígado, esta, sería una vía accesoria que requiere la presencia de peróxido de hidrógeno. La actividad de la catalasa “in vivo” está limitada por la presencia de H_2O_2 . La velocidad de producción de H_2O_2 por el hígado es bastante baja (Boveris y cols., 1972) por lo que probablemente esta ruta no juega un papel significativo en el metabolismo del etanol (Crabb y cols., 1979).

La reacción que podría tener lugar es:

Oxidasa



Catalasa

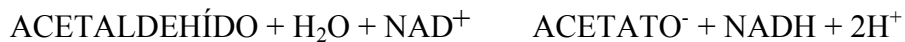


2.2.1.2.1. Metabolismo del acetaldehído

Al menos un 90% del acetaldehído derivado del metabolismo del etanol se produce en el hígado. La enzima principal en esta vía es la Aldehído-Deshidrogenasa dependiente de NAD.

En el hígado de mamíferos existen varias isoenzimas (Pietruszko, 1983; Tripton, 1985) capaces de oxidar el acetaldehído, siendo las más caracterizadas la ALDH1 y la ALDH2. La primera, esta situada en el citoplasma y posee una alta K_m de $100\mu\text{M}$ y la segunda se localiza en la mitocondria y posee una menor K_m de $1\mu\text{M}$ (Greenfield y Pietruszko, 1977). La coexistencia a nivel hepático de estas isoenzimas permite una oxidación inmediata y casi total del acetaldehído, manteniendo una baja concentración de este compuesto en sangre. Esta rápida eliminación del acetaldehído favorece, a su vez, la reacción de la ADH y aumenta la efectividad de la oxidación del etanol.

La reacción que se produce es la siguiente:



El acetato se metaboliza en hígado pero puede aparecer en sangre ya que el etanol inhibe su metabolismo hepático, siendo biotransformado entonces en los tejidos periféricos.

La mayoría de los efectos tóxicos del alcohol son atribuidos al acetaldehído y se han descrito niveles elevados de acetaldehído en alcohólicos (Nuutinen y cols., 1983) cuando se han comparado con poblaciones abstemias.

2.2.2. Efecto del etanol sobre el metabolismo

Carbohidratos

La administración de etanol puede producir hipoglucemia o hiperglucemia, dependiendo de los niveles de glucógeno hepáticos. Así en sujetos que han estado 12 horas en ayuno se produce una intolerancia a la glucosa tras una dosis de etanol (Dornhorst y Ouyang, 1971). El mecanismo principal para el desarrollo de la **hiperglucemia** es la disminución de la captación de glucosa en los tejidos periféricos, así como un aumento de la glucogenolisis. Esta última esta mediada por una activación de la fosforilasa, que produce un rápido descenso de los niveles de glucógeno hepáticos. Otra causa es un descenso en la glucólisis, lo que implica una menor producción de ATP y por lo tanto un aumento en la disponibilidad del ADP, el cual estimula la respiración mitocondrial. Esto produce un aumento de la reoxidación del NADH a NAD, necesario en la oxidación del etanol por la ADH (Forman, 1988).

La **hipoglucemia** se produce en sujetos que tienen los depósitos de glucógeno agotados debido al ayuno (Freinkel y cols., 1963). El principal mecanismo por el cual se produce es a través de una inhibición de la gluconeogénesis hepática causada por el etanol. Esta inhibición es debida a un aumento en la relación NADH/NAD como consecuencia del metabolismo del etanol. El incremento en esta relación reduce la concentración de piruvato y oxalacetato, esto provoca un descenso en la formación de fosfoenolpiruvato a partir de piruvato vía oxalacetato, el cual es un paso limitante en la gluconeogénesis.

Proteínas

La administración crónica de etanol produce un aumento de la excreción urinaria de nitrógeno en ratas y humanos (McDonald y Margen, 1976). Esta incrementada excreción en humanos se asocia con un balance negativo de nitrógeno y pérdida de peso. Estudios en ratas muestran que dosis agudas de etanol disminuyen la síntesis de proteínas en hígado y músculo (Preedy y cols., 1988 y 1992).

La administración crónica del etanol produce un acumulo de proteínas plasmáticas como son la albúmina, transferrina y glicoproteínas que son normalmente exportadas desde el hígado. El acetaldehído parece ser el responsable de este acumulo al inhibir la secreción (Forman, 1988).

Lípidos

La administración aguda de etanol produce una elevación de los niveles plasmáticos de triglicéridos (Johnson, 1974). Este aumento se debe a los VLDL mientras que los fosfolípidos y el colesterol plasmático permanecen sin alterarse. La elevación de los triglicéridos plasmáticos se ve potenciada si la comida es rica en grasas, y esta se mantiene durante las 12-36 horas seguidas a la ingesta de alcohol. La administración crónica del etanol con una dieta adecuada también produce un aumento de los niveles plasmáticos de triglicéridos. Esto se acompaña con un pequeño aumento de colesterol y fosfolípidos (Maruyama y cols., 1986).

El incremento de los niveles sanguíneos de triglicéridos tras la ingesta de alcohol es debido a una mayor producción y secreción hepática de lipoproteínas. En ratas la ingesta aguda y crónica de etanol no afecta el aclaramiento sanguíneo de triglicéridos (Baraona y Lieber, 1979).

Un hecho a tener en cuenta es el *hígado graso* asociado al consumo de alcohol (Lieber, 1984). Estos lípidos acumulados provienen del tejido adiposo, la dieta y lípidos sintetizados en el mismo hígado. La fuente de triglicéridos depende del contenido de grasas de la dieta y del consumo agudo o crónico del etanol. Del tejido adiposo provienen en caso de ingesta de una fuerte dosis aguda de etanol. La liberación de ácidos grasos en estas condiciones es similar a la que se observa en situaciones de estrés y esta mediada por la liberación de epinefrina.

Un aumento en la síntesis y un descenso en la degradación de ácidos grasos en el hígado se produce durante el consumo crónico de etanol (Baraona y Lieber, 1979). Este efecto es debido al aumento del cociente NADH/NAD como consecuencia del metabolismo del etanol. La síntesis se ve estimulada por un aumento del NADPH producido por la transferencia de equivalentes reducidos del NADH al NADP, mientras que la oxidación se

reduce por el efecto inhibitorio del cociente NADH/NAD incrementado sobre el ciclo de Krebs.

Además también se producen alteraciones mitocondriales relacionadas con el consumo de etanol que pueden afectar a la oxidación de los ácidos grasos.

Finalmente los ácidos grasos acumulados durante el consumo de etanol, son primariamente de origen endógeno hasta que se produce un aumento de la síntesis y un descenso en la degradación. El aumento en el acumulo de grasas de la dieta son debidas a dietas ricas en grasas.

Descenso en la liberación y formación de lipoproteínas no es la causa inicial del hígado graso inducido por el etanol, esto es evidente por el aumento que se produce en los niveles de triglicéridos plasmáticos. Este mecanismo parece ser consecuencia de una disfunción crónica hepática debida al consumo crónico de etanol.

2.2.3. Efectos del etanol en el músculo

2.2.3.1. Miopatía alcohólica

El reconocimiento actual de la enfermedad del músculo esquelético como consecuencia del abuso de alcohol, data de una serie de trabajos en los que Hed y cols., (1955 y 1962) describieron dos entidades clínicas diferenciadas: *las miopatías alcohólicas aguda y crónica*. Además, estos investigadores percibieron la existencia de leves cambios electromiográficos o histológicos que sugieren la existencia de frecuentes alteraciones musculares subclínicas en los pacientes. Estudios posteriores han comprobado ampliamente estas observaciones iniciales identificando, además, diversas anomalías bioquímicas en el músculo relacionadas con el alcohol, que pudieran tener importancia en la patogenia de estos trastornos.

Perkoff, (1971), clasificó las distintas miopatías en: miopatía alcohólica subclínica, miopatía alcohólica aguda y miopatía alcohólica crónica; posteriormente Spargo, (1981) desarrolló la clasificación incluyendo la necrosis focal como una característica de la miopatía aguda y a la neuropatía muscular como característica de la miopatía alcohólica crónica.

En el desarrollo del estudio histoquímico de biopsias musculares (Dubowitz, 1981) se ha mostrado una caracterización mas precisa del daño muscular en los casos de miopatía crónica. Slavin y cols., (1983), también distinguen histopatológicamente entre la forma aguda y crónica de forma satisfactoria. Según Martin y Peters, (1985 a y b) ambas pueden coexistir, y pueden ser obviamente clínicas o subclínicas.

2.2.3.1.1. Miopatía alcohólica aguda

La miopatía alcohólica aguda es un síndrome de necrosis muscular aguda que se da en alcohólicos agudos. Su gravedad varía ampliamente, desde aumento asintomático pasajero de la fracción MM de la creatín-fosfoquinasa sérica hasta una rhabdmiolisis (rotura parcial de fibras) patente con mioglobinuria.

La miopatía alcohólica aguda se caracteriza por la presencia de debilidad y dolor muscular con o sin parálisis. Se asocia con elevados niveles en suero de creatín fosfoquinasa, (Velez-García y cols., 1966; Perkoff y cols., 1967; Lafair y Myerson, 1968; Myerson y Lafair 1970) y Lactato deshidrogenasa (Pittman y Decker, 1971; Spector y cols., 1979). Otra complicación reconocida es la mioglobinuria (Hed y cols., 1955; Fahlgren y cols., 1957; Hed y cols., 1962; Perkoff y cols., 1967), que puede inducir necrosis tubular aguda acompañada de fallo renal (Valaitis y cols., 1960; Koffler y cols., 1976).

Alteraciones iniciales: La lesión muscular provoca la aparición de diversas enzimas provenientes del interior de los miocitos, en el plasma. Así se ven aumentadas las actividades plasmáticas de aldolasa, AST, LDH y CK. Esta última es el indicador más sensible (Perkoff, 1971) y puede aumentarse su especificidad si se demuestra que la isoenzima elevada es la muscular (MM) y no a la cardíaca (MB) (Perkoff y cols., 1967; Hanid y cols., 1981).

Rhabdmiolisis aguda. Se denomina rhabdmiolisis aguda, a la forma grave de miopatía aguda. Esta da lugar a un cuadro clínico característico descrito por Hed y cols., (1962) en el que destaca la existencia de dolor, tumefacción y debilidad de uno o más grupos musculares. En muchos casos los síntomas afectan de forma notable a los músculos de las extremidades. A menudo existe el antecedente de una reciente ingesta de alcohol y los síntomas pueden recurrir tras sucesivos abusos de etanol. Aparece de forma constante mioglobinuria.

La mioglobinuria puede dar lugar a la complicación más grave de la rhabdmiolisis alcohólica, una necrosis tubular aguda e insuficiencia renal, que en algunos casos puede causar la muerte (Hed y cols., 1962) aunque esta complicación es infrecuente (Soler y cols., 1988). En la mayoría de los pacientes la enfermedad muscular desaparece de forma espontánea y el restablecimiento ocurre de manera característica en días o semanas.

La incidencia general de rhabdmiolisis aguda es desconocida y las estimaciones varían según el criterio para la selección de los pacientes entre un 1 y 3 por 1.000 de los alcohólicos que ingresan en un hospital (Martin y cols., 1982). En su mayoría afecta a los hombres.

El dato anatomopatológico característico consiste en necrosis de fibras musculares, seguida de degeneración y regeneración de las fibras (Ekbohm y cols., 1964; Klinkerfuss y cols., 1967; Martin y cols., 1982).

Martinez y cols., (1973), describieron perdida irregular de actividad enzimática oxidativa que afecta principalmente a las fibras de tipo I, como dato histoquímico temprano de la miopatía alcohólica aguda, y sugirieron que las fibras de tipo I eran selectivamente susceptibles a esta clase de lesión.

En rhabdomiolisis alcohólica se ha apreciado una hipercalcemia (Fahlgren y cols., 1957; Hed y cols., 1962; Kahn y Meyer, 1970) que probablemente en combinación con una anormal liberación de potasio desde las fibras necrosadas provocan una insuficiencia renal. El cuadro histológico también presenta exceso de grasa intra y perifibrilar lo que puede ser una característica importante en la miopatía alcohólica aguda (Ekbom y cols., 1964; Hughes, 1974).

También aparecen actividades reducidas de miosín-ATPasa y NADH cuando se han valorado por métodos histoquímicos (Martin y cols., 1985). Estudios en microscopía electrónica muestran una desintegración y separación de miofilamentos (Douglas y cols., 1966; Fisher y cols., 1971), dilatación del retículo sarcoplásmico (Klinkerfuss y cols., 1967), y agregados tubulares adyacentes del sarcolema (Chui y cols., 1975).

2.2.3.1.2. Miopatía alcohólica crónica

La miopatía alcohólica crónica consiste en un progresivo y frecuente dolor, debilidad y desgaste de grupos de músculos proximales, particularmente en las piernas (Ekbom y cols., 1964). Es normal que se produzca atrofia muscular en mayor o menor grado, pudiendo aparecer además, ligado a la miopatía, carencias nutricionales y neuropatía periférica alcohólica. Esta miopatía se asocia a una ingesta continuada de alcohol que en algunos pacientes se ha descrito en cantidades superiores a 100 g al día durante más de diez años.

Con el desarrollo de la técnica miosín ATP-asa (Dubowitz y Brooke, 1973) se ha podido caracterizar de forma precisa la miopatía muscular crónica, incluso el desgaste subclínico, es decir, el que no manifiesta los síntomas.

Mediante estas técnicas se ha determinado una atrofia de las fibras de tipo II (Kiessling y cols., 1975; Hanid y cols., 1981; Martin y cols., 1982; Peters y cols., 1985; Trounce y cols., 1990), que es la manifestación histológica principal de esta patología. Posteriores observaciones demuestran que la atrofia es predominantemente de las fibras tipo IIB que poseen menor capacidad oxidativa que las IIA (Slavin y cols., 1983; Martin y cols., 1985).

Pueden observarse también exceso de lípidos y glucógeno entre las miofibrillas y el sarcolema adyacente (Klinkerfuss y cols., 1967; Chui y cols., 1975), y descenso en el número

(Douglas y cols., 1966; Fisher y cols., 1971) y en el volumen (Kiessling y cols., 1975) de las mitocondrias.

Es desconocida la relación entre la miopatía alcohólica aguda y crónica. La existencia de pacientes que muestran síntomas de ambas (Perkoff y cols., 1967; Lafair y Myerson., 1968; Pittman y Decker, 1971) ha sugerido que comparten una causa común (Perkoff, 1971). Por otra parte, es característico que en pacientes con miopatía crónica no se presenten antecedentes de miopatía alcohólica aguda o viceversa (Ekbohm y cols., 1964; Aström, 1970). Estas consideraciones, además de las diferencias peculiares en los datos clínicos de laboratorio e histológicos entre ambas miopatías apoyan la hipótesis de la diferente patogenia (Martin y cols., 1982).

En la siguiente tabla se muestran los datos más significativos en ambos tipos de miopatías:

	Miopatía aguda	Miopatía crónica
Ingesta de alcohol	Ocasional	Constante
Síntomas y signos	Dolor tumefacción y debilidad musculares	Atrofia, debilidad
Músculos afectados	Focos, a menudo distales	Proximal y simétrica
Creatín-fosfoquinasa	Aumento	A menudo normal
Biopsia muscular	Necrosis de fibras esparcidas, susceptibilidad de tipo I	Atrofia y denervación de fibras de tipo II
Neuropatía asociada	A veces	Frecuentemente
Población afectada	Gran predominio de varones	Varones Mujeres
Enfermedades asociadas	Abstinencia de alcohol, delirium tremens	Carencia nutricional, neuropatía periférica

2.2.3.1.3. Patogénesis de las miopatías

La aparición histológica de *miopatía aguda* sugiere un aumento de fluido intracelular por lo cual puede estar implicado un cambio en la fluidez de la membrana. El etanol altera la fluidez de las membranas celulares (Wilson y Hoyumpa, 1979) esto puede ser la causa del edema intracelular y del abultamiento mitocondrial observado en miopatías agudas.

Otra evidencia del efecto patológico del etanol en las membranas es el aumento de la actividad creatín-fosfoquinasa en el suero en voluntarios sanos en respuesta a la ingestión de etanol (Lafair y Myerson, 1968). En ratas tras una dosis de alcohol elevada se observan cambios transitorios que consisten en hinchazón o aumento del volumen en las mitocondrias (Munsat y cols., 1973).

El papel de estos cambios en el desarrollo de la miopatía aguda es desconocido. La rata ha sido el único modelo animal utilizado para producir la rhabdomiólisis que se obtiene en un periodo de 2-4 semanas de ingesta de etanol y un corto periodo de privación de alimento (Haller y Drachman, 1980), en ellas los cambios patológicos se acompañan con una deficiencia de las concentraciones de fosfato en los tejidos. Anderson y cols., (1980) muestran que hay deficiencia en fósforo y magnesio en los tejidos y proponen el papel patogénico del fósforo.

Esta sugerencia es consistente con las observaciones de alteraciones patológicas reversibles en células musculares en experimentos de deficiencia en fósforo.

En cuanto a la *miopatía crónica* se creyó relacionada con la neuropatía periférica, considerándose esta como el primer problema (Faris y Reyes, 1971), sin embargo estudios posteriores muestran cambios miopáticos sin daño nervioso asociado (Worden, 1976).

La forma clínica predominante de neuropatía en alcohólicos es la neuropatía sensorial distal simétrica, es decir anomalías en los nervios sensoriales periféricos, (Ekbohm y cols., 1964). Hay suficientes evidencias que ponen de manifiesto un retraso en la conducción nerviosa motora que afectaría a los nervios motores distales.

Guiheneuc y Bathien, (1976) y Liberson y cols., (1979), mostraron una reducida respuesta refleja y disminución en la velocidad de conducción en los segmentos proximales de los nervios periféricos de alcohólicos crónicos. Por su parte Martin y cols., (1985), concluyen que la miopatía crónica es una consecuencia muy frecuente del abuso del alcohol y puede ser debida a un efecto tóxico directo del etanol sobre el músculo. Posteriormente Mills y cols., (1986), concluyen que la miopatía alcohólica es debida a un efecto tóxico del etanol sobre las fibras musculares, y no es secundaria a la miopatía periférica.

Estudios más recientes muestran que las dos patologías pueden coexistir pero su patogenia es distinta (Mills y cols., 1986).

La atrofia selectiva de las fibras de tipo IIB parece estar relacionada con un daño en las vías energéticas glucolíticas. Así Kiessling y cols., (1975) asocian una deficiencia en la actividad lactato-deshidrogenasa y trifosfatasa deshidrogenasa, a la atrofia de tipo II encontrada en los animales. También Haller y Knochel, (1984), hallaron un descenso generalizado de las actividades glucolíticas de hombres con miopatía alcohólica crónica al compararlos con controles.

3. Material y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Animales de experimentación

Se han empleado durante la realización del presente trabajo 40 ratas macho de raza Wistar (*Rattus norvegicus*), cuyo peso inicial estuvo comprendido entre 90 - 110 gramos y cuyo crecimiento fue controlado dos veces por semana.

Los animales fueron mantenidos en el estabulario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León en condiciones controladas de luz, (12 horas de iluminación y 12 de oscuridad), y de temperatura (22 ± 2 °C).

La alimentación de los animales se llevó a cabo con una dieta estándar para ratas, comercializada por Panlab S.A. (Barcelona). En todos los experimentos las ratas tenían libre acceso a la comida y al agua de bebida, la cual se renovaba dos veces por semana, salvo los grupos tratados con etanol, en los cuales la renovación era diaria.

3.1.2. Reactivos

Se han utilizado en todos los casos reactivos de grado analítico para el trabajo normal de laboratorio suministrados por PANREAC, SCHARLAU, MERCK, FLUKA y LEO.

3.1.3. Material de laboratorio

El material de laboratorio utilizado en el presente trabajo puede catalogarse en los siguientes apartados

- Aparatos de uso general.
- Material específico de análisis hematológicos.
- Material específico para el desarrollo del ejercicio.
- Material específico de los análisis histoquímicos y morfométricos.

3.1.3.1. Aparatos de uso general

En este apartado se incluye:

- Balanzas de precisión Sartorius MP, 8-6, y Sartorius Research R-200 D.
- Centrífugas refrigeradas Sorvall RC-5B, y Jovan BR 3-11.
- Medidor de pH CRISON microp H 2001.
- Baño ultrasónico SONOTEX TK-52.
- Homogeneizador POLYTRON (KINEMATICA).
- Baños termostáticos SELECTA.
- Espectrofotómetro mono haz SPECTRONIC 1201 (MILTON ROY).
- Espectrofotómetro doble haz U-2000 (HITACHI).
- Material quirúrgico diverso.
- Material propio del laboratorio de fisiología de la Universidad de León.

3.1.3.2. Material específico de análisis hematológicos

- Fotómetro de reflexión compacto REFLOTRON (BOEHRINGER MANNHEIM).
- Centrífuga de microhematócrito HAEMOFUGE A (HERAEUS).
- COULTER COUNTER (S-PLUS JR).

3.1.3.3. Material específico para el desarrollo del ejercicio

- Treadmill modelo LI 8706, Instrumentos Científicos, Barcelona.

3.1.3.4. Material específico para los análisis histoquímicos y morfométricos

- Histocriotomo (LEITZ).
- Microscopios ópticos: Optiphot (NIKON) y Laborlux (LEITZ).
- Cámara fotográfica NIKON.
- Cámara clara.
- Tarjeta digitalizadora Genitizer-GT-1212B.
- Portaobjetos, cubreobjetos, cubetas para tinciones y otro material propio de un laboratorio de histología.

3.2. Metodología

3.2.1. Diseño experimental

Los animales utilizados para la realización del presente trabajo fueron separados en cuatro grupos, de diez ratas cada uno, para la aplicación del tratamiento correspondiente:

- **GRUPO I** :Control
- **GRUPO II** :Etanol
- **GRUPO III** :Ejercicio
- **GRUPO IV** :Ejercicio-Etanol

El peso de los animales era controlado semanalmente a lo largo de los tres meses que duró el experimento.

3.2.2. Administración crónica del etanol

Para lograr la alcoholización del modelo animal, dos son los planteamientos iniciales:

Administración forzada en animales sin tendencia espontánea al consumo de etanol. El medio de administración varía desde la inhalación de vapores de etanol, hasta la intubación gástrica, o la infusión intravenosa entre otras. Estos protocolos proveen al animal de cantidades precisas de etanol, alcanzando un nivel de alcoholización estable en sangre, desarrollándose pronto la dependencia. A pesar de estas ventajas, este modelo ocasiona inevitablemente estrés, y además se aleja considerablemente de la vía de alcoholización en humanos.

Administración semiforzada de etanol. Consiste en la administración de etanol mezclada con el alimento sólido o en el agua de bebida. Si bien Lieber y De-Carli (1989) cuestionan la administración de etanol en el agua de bebida debido al daño hepático que produce y a que los niveles sanguíneos de alcohol, no son sostenidos, la simplicidad de dicho procedimiento (reconocido por estos autores frente al empleo de dietas líquidas Lieber y De-Carli, 1986 y 1989) junto a la similitud con la vía de ingesta en humanos han sido los principales determinantes para su utilización en la presente memoria.

La alcoholización crónica de las ratas se consiguió administrando la solución de etanol como líquido de bebida acompañando a una dieta sólida. De este modo los grupos II y IV fueron sometidos a una alcoholización progresiva de 7 días con un 5% de etanol en el agua de bebida, 7 días con un 10% y finalmente se mantenían durante tres meses con etanol al 15%. El consumo de bebida era controlado diariamente.

3.2.3. Protocolo de ejercicio

De los cuatro grupos experimentales, dos de ellos, el III y IV fueron sometidos a un programa de ejercicio que consistió en carreras desarrolladas en un Treadmill dotado con control de velocidad, y pendiente.

La duración del protocolo de ejercicio fue de 12 semanas, en las cuales los animales corren dos días seguidos, descansan uno, corren dos y descansan dos.

El protocolo de ejercicio fue el siguiente:

Semana	Duración (min)	Velocidad (m/min)	Pendiente %
1 ^a	30	20	0
2 ^a	35	20	5
3 ^a	40	20	5
4 ^a	40	21	7
5 ^a	45	21	7,5
6 ^a	45	22	7,5
7 ^a	50	22	10
8 ^a	50	23	10
9 ^a	55	23	10
10 ^a	55	23	12,5
11 ^a	60	24	12,5
12 ^a	60	24	15

3.2.4. Obtención de muestras

Acabado el periodo de entrenamiento (12 semanas), las ratas permanecían en el estabulario durante 24 horas previamente a las intervenciones quirúrgicas, con el fin de observar las condiciones basales y de adaptación a los diferentes tratamientos y no al ejercicio realizado de forma aguda el último día.

3.2.4.1. Anestesia

Los animales fueron anestesiados con éter para la obtención de las muestras sanguíneas a las 4 y 8 semanas del tratamiento.

Para la obtención de las muestras al final del tratamiento los animales fueron anestesiados usando uretano al 30% (p/v) en dosis de 1 ml por cada 250 gramos de peso corporal.

3.2.4.2. Obtención y preparación de muestras de sangre

Las extracciones de sangre realizadas al final de la 4^a, 8^a y 12^a semana se llevaron a cabo por micropunción del plexo retroorbicular mediante tubos capilares de microcentrífuga (Riley, 1960). La sangre era recogida en tubos previamente heparinizados e inmediatamente colocada en hielo.

3.2.4.3. Obtención y preparación de músculos e hígados

Tras anestesiar los animales se procedió a la extracción del hígado y de los músculos sóleo, gastrocnemio y plantaris.

El hígado fue extraído, lavado en solución salina, pesado y almacenado a -80 °C en paquetes de un gramo para posteriores análisis.

Los músculos de la pata posterior izquierda, previamente pesados, fueron congelados mediante el método propuesto por Dubowitz y Brooke (1973). Para ello en un vaso de precipitados de 100 ml, al cual se ha adaptado un asa, se le añade 2-metilbutano (isopentano) y se sumerge con cuidado en un frasco Derval conteniendo en cantidad suficiente Nitrógeno líquido (-160 °C), para enfriar el isopentano. Cuando este se encuentre ya congelado, formando precipitados blancos en el fondo y paredes del vaso (para evitar artefactos de congelación) se sumerge la muestra el tiempo necesario para la perfecta congelación. Una vez congelada se introduce directamente en el nitrógeno líquido y posteriormente los músculos son almacenados en un congelador a -80 °C hasta ser procesados en las distintas técnicas histoquímicas para el estudio de composición y tamaño fibrilar.

Los músculos sóleo, gastrocnemio y plantaris de la pata posterior derecha fueron homogeneizados en la proporción 1/20 (p/v) en un medio conteniendo 2 mM de MgCl₂, 2 mM EDTA, 50 mM TRIS a pH 7,4, en hielo, y sometidos a varios intervalos de 30 segundos de sonicación para la perfecta homogeneización de las muestras. Posteriormente se valoraron en los homogenados las actividades enzimáticas para el estudio del metabolismo muscular.

3.2.5. Análisis de muestras sanguíneas

3.2.5.1. Parámetros bioquímicos

3.2.5.1.1. Determinación de glucosa

Se utilizó el test comercial "Reflotron Glucose" basado en la acción de la glucosa oxidasa (GOD). Mediante la GOD se oxida D-glucosa a D-gluconolactona, formándose H₂O₂.

Este oxida el indicador 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en presencia de peroxidasa (POD). La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de glucosa en sangre, y se mide a 642 nm en un fotómetro de reflexión.

3.2.5.1.2. Determinación de triglicéridos

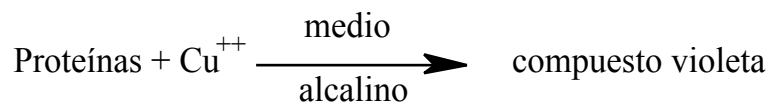
Se realizó mediante el test comercial "Reflotron Triglyceride". Se basa en la acción de una esterasa que hidroliza los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado con ATP mediante la glicerokinasa (GK) a L-glicerol-fosfato. Este último es oxidado bajo la catálisis de la enzima L- glicerol-fosfato-oxidasa (GPO) por el oxígeno del aire, a hidroxiacetonafosfato. El peróxido de hidrógeno formado simultáneamente oxida un indicador redox bajo la acción catalítica de la peroxidasa (POD). Como resultado aparece un color azul cuya intensidad aumenta de forma proporcional a la concentración de triglicéridos de la muestra. La reacción se detecta mediante la variación de absorbancia a 642 nm.

3.2.5.1.3. Determinación de urea

Mediante el test "Reflotron Urea". La urea contenida en la muestra se hidroliza a carbonato de amonio liberando amoniaco debido al tampón alcalino. El amoniaco formado difunde a través de una malla hidrófoba, originando un cambio parcial de color de un indicador tamponado (cambio de color del amarillo verde azul), cuya concentración es proporcional a la concentración de urea de la muestra. Se mide a una longitud de onda de 642 nm.

3.2.5.1.4. Determinación de proteínas totales

Los enlaces peptídicos reaccionan con los iones cobre en medio alcalino formando un compuesto violeta con un máximo de absorción a 540 nm según la siguiente reacción:

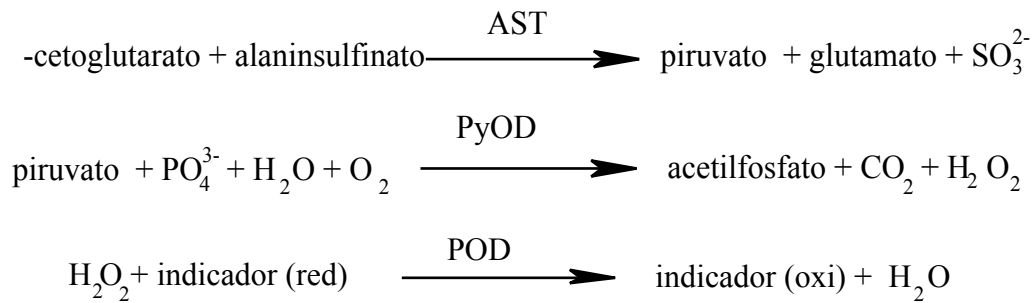


3.2.5.2. Parámetros enzimáticos

3.2.5.2.1. Determinación de la aspartato-transaminasa (AST)

Fue medido a través del test "Reflotron AST" que se basa en la reacción de - cetoglutarato y ácido alaninsulfínico a piruvato y glutamato, catalizada por la AST. En la segunda reacción el piruvato se hidroliza bajo la acción de la piruvato-oxidasa a acetilfosfato,

anhídrido carbónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En presencia de la enzima peroxidasa (POD), el H_2O_2 oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma oxidada azul:



A través de una medición cinética a 567 nm se sigue el desarrollo del colorante como medida de la actividad enzimática de la AST.

3.2.5.2.2. Determinación de la alanín-transaminasa (ALT)

Se realizó mediante el test "Reflotron ALT". La ALT cataliza la reacción de -cetoglutarato y alanina a piruvato y glutamato. En la segunda reacción (común a la de la AST) el piruvato se hidroliza a acetilfosfato y anhídrido de carbono, mediante la acción de la piruvato oxidasa produciéndose H_2O_2 . En presencia de la peroxidasa (POD), el H_2O_2 oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma azul, al igual que en la anterior. A través de una medición cinética a 567 nm se sigue el desarrollo del colorante como medida de la actividad enzimática de la ALT:



3.2.5.2.3. Determinación de -glutamilttransferasa (-GT)

Para su determinación se utilizó el test "Reflotron GGT". La -GT cataliza la reacción de -glutamilt-3-carboxi-1,4-fenilendiamina con glicilglicina a 3-carboxi-1,4 fenilendiamina y -glutamiltglicilglicina. En la siguiente reacción el ferricianuro potásico oxida la 3-carboxi1,4-fenilendiamina en presencia de ácido N-metilantranílico, a una sustancia de color azul verdoso. A través de una medición cinética a 642 nm, se sigue el desarrollo del colorante como medida de la actividad enzimática de la -GT.

3.2.5.2.4. Determinación de fosfatasa alcalina (PAL)

Se ha realizado el cálculo de la fosfatasa alcalina en sangre no distinguiéndose su procedencia, ósea o hepática.

Fundamento

La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis de p-nitrofenilfosfato en presencia de Mg^{2+} , liberando p-nitrofenol, cuya monitorización espectrofotométrica facilita la medición de la actividad catalítica de la fosfatasa alcalina.

3.2.5.2.5. Determinación de la creatín-fosfoquinasa total (CPK)

La CPK cataliza la fosforilación reversible de la creatinina. En esta reacción, el ATP actúa como dador del grupo fosfato. Posteriormente se acoplan las actuaciones de las enzimas: hexoquinasa y la glucosa-6-P-deshidrogenasa. Como resultado de estas reacciones se forma NADPH el cual es detectado a una longitud de onda de 340 nm.

3.2.5.2.6. Determinación de la lactato deshidrogenasa (LDH)

La enzima LDH cataliza la reacción entre el piruvato y el lactato. El equilibrio depende del pH: un pH neutro favorece el paso de piruvato a lactato, mientras que un pH alcalino produce el efecto opuesto.

Fundamento

La reacción produce la desaparición de NADH pudiendo ser cuantificada a una longitud de onda de 340 nm.

3.2.5.3. Parámetros hematológicos

3.2.5.3.1. Determinación de hemoglobina

Se utilizó el test comercial "Reflotron Hemoglobin" basado en la oxidación de la hemoglobina con ferricianuro potásico a metahemoglobina ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$). En la siguiente reacción con cianuro mercuríco la metahemoglobina pasa a cianometahemoglobina. La intensidad de color de esta es medida a 567 nm.

3.2.5.3.2. Determinación de hematócrito

Para la determinación de este valor se ha seguido un método directo, denominado micrométodo, que consiste en la centrifugación de la muestra de sangre dentro de un capilar de hematócrito. Se emplean para ello tubos capilares de aproximadamente 1 mm de diámetro y de 70 mm de longitud, con una capacidad de 70 μ l y con heparina en su interior como anticoagulante.

El llenado del capilar se realizó directamente por micropunción con el mismo del plexo retroorbicular. Se tomaron muestras por duplicado. Una vez lleno se sella uno de los extremos con plastilina y a continuación se sitúa en uno de los surcos radiales del plato base de la centrifuga de hematócrito, dejando el extremo sellado hacia afuera. La muestra se centrifuga a 11.000 rpm durante 10 minutos. El resultado de la centrifugación de la muestra es la separación de sus dos componentes, el plasma hemático, y los corpúsculos formes; hematíes, leucocitos y plaquetas. La lectura del volumen de hematíes se realiza mediante un lector de microhematócrito.

3.2.5.3.3. Determinación del recuento eritrocitario (RBC) y de los índices eritrocitarios (VCM, HCM, CHCM)

Las determinaciones del número de hematíes (RCB), se realizó automáticamente mediante un COULTER COUNTER en sangre entera usando EDTA como anticoagulante.

El cálculo de los índices eritrocitarios: volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), se detalla a continuación:

1. La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) es el porcentaje de hemoglobina en 100 ml de eritrocitos.

$$\text{CHCM (\%)} = \frac{\text{concentración de hemoglobina (g/dl)}}{\text{hematócrito}} \times 100$$

2. El volumen corpuscular medio (VCM) es el volumen medio de un eritrocito aislado (μ^3)

$$\text{VCM} = \frac{\text{hematócrito (\%)}}{\text{RCB (mll/mm}^3\text{)}} \times 10$$

3. La hemoglobina corpuscular media (HCM) es el contenido medio de hemoglobina de un eritrocito aislado.

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{concentración de hemoglobina (g/dl)}}{\text{recuento de eritrocitos (mll/mm}^3\text{)}} \times 10$$

3.2.5.3.4. Determinación de la curva de fragilidad osmótica

Fundamento

El método utilizado está basado en el de Papart y cols., (1947). Se usa solución salina hipotónica tamponada a pH 7,4, se añade la sangre a la solución en la proporción de 1/100 (v/v). La prueba se lleva a cabo incubando a 37 °C los viales que contienen la sangre y la solución salina. Posteriormente se valora la hemólisis por espectrofotometría.

Preparación de las muestras

Se prepara una solución de cloruro de sodio al 1% como solución madre, a partir de ésta, se realizan 15 diluciones con agua desionizada comprendidas entre 0,154 mM y 0,034 mM, con un volumen final de 5 ml.

Procedimiento

Para la realización del proceso se emplea sangre fresca tratada con anticoagulantes. Inmediatamente a la extracción de las muestras se toman volúmenes de 50 µl y se van añadiendo a cada una de las diluciones hipotónicas, se agita suavemente, y se incuban las muestras a 37 °C durante 60 minutos. Tras la incubación se centrifugan las muestras 10 minutos a 3000 rpm. La lectura de la hemólisis se hace midiendo la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 540 nm. El sobrenadante del tubo con la dilución 0,154 mM se toma como blanco, y una solución totalmente hemolizada se preparó añadiendo 50 µl de sangre a 5 ml de agua desionizada para obtener el 100% de hemólisis. Fueron utilizadas 5 replicas de cada grupo.

Las curvas de hemólisis fueron obtenidas de los datos experimentales de acuerdo con la ecuación propuesta por Detraglia y cols., (1974):

$$H = \frac{1}{e^{\beta(X-X_{50})} + 1}$$

Donde a partir de H (fracción de células hemolizadas) y X (concentración de NaCl mM), se obtienen, la X_{50} (H_{50}) fragilidad eritrocitaria media y β que es una medida de la amplitud de la distribución de las distintas poblaciones eritrocitarias frente a la lisis osmótica.

3.2.6. Análisis de muestras hepáticas

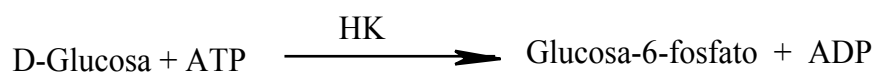
3.2.6.1. Determinación de glucógeno y glucosa

Preparación de la muestra

Se homogeniza 1 gramo de hígado en 5 ml de HClO₄ al 2% y el homogeneizado se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos recogiendo el sobrenadante.

Determinación de glucosa libre: se realizó mediante el método de la hexoquinasa (HK) y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6-P-DH).

Fundamento



El incremento de absorbancia provocado por la formación de NADPH se determinó a 340 nm.

Reactivos

Tampón Tris-HCl 0,1 M pH 7,8

MgCl₂ 0,1 M

NADP 10 mM

ATP 10 mM

HK 1 UI/ml en (NH₄)₂SO₄ 3,2 mM

G-6-P-DH 2 UI/ml en (NH₄)₂SO₄ 3,2 mM

Método

Del sobrenadante anteriormente recogido, se toma 1 ml y se neutraliza con KHCO₃ sólido y se centrifuga durante 5 minutos a 3.000 rpm. A 50 µl del sobrenadante se añadieron 450 µl de H₂O y 500 µl de una mezcla conteniendo 10 ml de tris-HCl (0,1 M), 1 ml de MgCl₂ (0,1 M), 2 ml de H₂O, 10 mg de NADP y 8 mg de ATP. Tras agitación se medía la absorbancia inicial a 340 nm, desencadenándose la reacción mediante la adición a la cubeta de 3 µl de la mezcla enzimática (HK-G-6P-DH), volviéndose a medir la absorbancia una vez transcurridos 10 minutos.

Determinación de glucógeno

Se valoró inicialmente glucosa libre en hígado y su valor se restó de la determinación de glucosa total tras la hidrólisis del glucógeno mediante la técnica de Keppler y Decker (1974): 0,2 ml de muestra se ponen en contacto con amiloglucosidasa con el fin de hidrolizar

el glucógeno, incubándose para ello durante 2 horas a 40 °C junto con 0,1 ml de KHCO_3 (1 M). A continuación se neutraliza con KHCO_3 sólido y se centrifuga a 3.000 rpm durante 5 minutos, determinándose la glucosa total en el sobrenadante por el método anteriormente descrito.

El cálculo del glucógeno hepático se realiza restando al incremento de absorbancia correspondiente a la glucosa total, el incremento de absorbancia correspondiente a la glucosa libre presente en el hígado.

3.2.7. Análisis de muestras musculares

3.2.7.1. Análisis enzimáticos

Con el fin de conocer los posibles cambios energéticos del músculo se determinaron las siguientes enzimas: Citrato sintasa (EC 4.1.3.7.) para el metabolismo aeróbico ; Hexoquinasa (EC 2.7.1.1.), Piruvato quinasa (EC 2.7.1.40.) y Lactato deshidrogenasa (1.1.1.27.) para el metabolismo glucolítico, y para el metabolismo de los ácidos grasos la 3-hidroxi-acil-Coenzima A-deshidrogenasa (EC 1.1.1.35.). Los análisis se realizaron a 30 °C.

3.2.7.1.1. Determinación de la enzima citrato sintasa (CS)

Se ha seguido el método propuesto por Srere y cols., (1963).

Fundamento

La citrato sintasa (CS) cataliza, de forma reversible, la unión de oxalacetato a Acetil-CoA, para formar citrato y CoA. La actividad de la CS puede seguirse midiendo la aparición de grupos SH liberados de la CoA-SH; para ello en presencia de 5,5'-Ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB), se forma un ión mercaptido que presenta una fuerte absorción a 412 nm.

Reactivos

DTNB, 1 mM en Tris-HCl 1 M pH 8,1

Acetil-CoA, 10 mM en agua

Oxalacetato, 10 mM en Tris-HCl 0,1 M

Método

A una cubeta se le añaden 100 μl de DTNB, 30 μl de Acetil-CoA, 50 μl de la muestra (a una dilución adecuada) y 770 μl de agua.

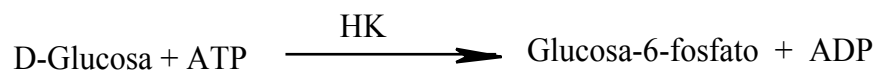
Se sigue la cinética de la reacción a 412 nm ($E=13,6$) para medir la posible actividad acetil-CoA-deacilasa. La reacción se inicia mediante la adición de 50 μl de oxalacetato y la velocidad de la reacción es seguida al menos durante 3 minutos.

3.2.7.1.2. Determinación de la enzima hexoquinasa (HK)

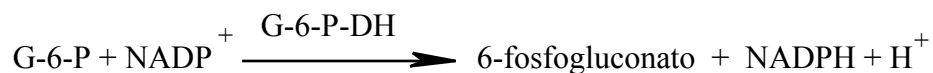
La hexoquinasa fue determinada por el método de Bergmeyer, (1974a).

Fundamento

La hexoquinasa cataliza la fosforilación de la glucosa mediante ATP a glucosa-6-fosfato (G-6-P).



El rango de formación de G-6-P se mide por una reacción acoplada, en la cual mediante la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa pasa a 6-fosfogluconato, reduciendo el NADP a NADPH.



Reactivos

Tris-HCl, 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5

MgCl₂, 8 mM

Glucosa, 2 mM

ATP, 0,02 M

NADP, 2 mM

Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6P-DH), 140 U/ml

Método

Se añaden en la cubeta 500 μl de Tris-HCl, 100 μl de Cl₂Mg, 100 μl de glucosa, 100 μl de ATP, 100 μl de NADP, 50 μl de G-6P-DH, y 50 μl de muestra.

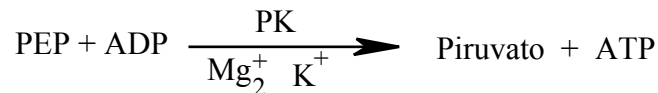
La reacción se mide a 37 °C siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm durante 5 minutos.

3.2.7.1.3. Determinación de la enzima piruvato quinasa (PK)

Se ha seguido el método propuesto por Bergmeyer (1974b).

Fundamento

La piruvato quinasa cataliza la fosforilación del ADP a ATP mediante el paso de fosfoenol-piruvato (PEP) a piruvato como podemos apreciar en la siguiente reacción:



El rango de formación del piruvato es medido por una reacción acoplada en la que se oxida el NADH a NAD⁺ mediante la acción de la lactato- deshidrogenasa (LDH):



Reactivos

Tris-HCl 1 M, EDTA, 5 mM pH 7,5

KCl 1,5 M

MgSO₄ 10 mM

ADP 100 mM

LDH libre de PK 100 U/ml

PEP 25 mM

NADH 1,5 mM

Método

A una cubeta se añaden 100 µl de Tris-HCl, 100 µl de KCl, 100 µl de MgSO₄, 100 µl de NADH, 50 µl de ADP, 100 µl de LDH, 20 µl de muestra y 330 µl de agua.

Se incuba durante 10 minutos a 37 °C y a continuación se dispara la reacción mediante la adición de 100 µl de PEP. Se sigue la extinción de NADH a 340 nm a 30 °C.

3.2.7.1.4. Determinación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Se ha seguido el método propuesto por Kornberg, (1955).

Fundamento

La lactato-deshidrogenasa cataliza la reducción del piruvato a lactato mediante el paso de NADH a NAD⁺:



Reactivos

Piruvato-sódico 0,01 M

NADH 0,002 M

Tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M, pH 7,4

NaCl 0,01 M

Las diluciones de las muestras se realizan en NaCl frío.

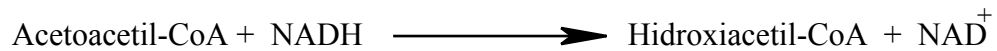
Método

Se añade en la cubeta 100 μl de tampón fosfato, 100 μl de NADH, 675 μl de agua y 25 μl de muestra. Se lee la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos a 37 °C. Posteriormente se añade 100 μl de Piruvato-sódico y se valoran los cambios de absorbancia durante 5 minutos.

3.2.7.1.5. Determinación de la enzima 3-hidroxi-Acil-CoA-deshidrogenasa (HAD)

Esta enzima fue determinada por el método de Bradshaw y Noyes., (1975).

La actividad de esta enzima es medida de forma rutinaria por el paso de S-acetoacetil éster al correspondiente hidroxicomponente, pasando el NADH a NAD^+ .



Reactivos

Tampón Trietanolamina-HCl (TEA) EDTA, pH 7

TEA 100 mM; EDTA 5 mM

NADH 0,28 mM

Aceto-acetil-CoA 0,25 mM (en tampón)

Método

Se añade en la cubeta 840 μl de tampón, 100 μl de NADH, 40 μl de Aceto-acetil-CoA y 20 μl de muestra. La reacción se mide a 30 °C siguiendo la disminución de densidad óptica a 340 nm.

3.2.7.2. Análisis histológicos e histoquímicos

3.2.7.2.1. Obtención de los cortes musculares

Las muestras de los músculos sóleo, gastrocnemio y plantaris, son fijados a los soportes del histocriotomo mediante una pequeña cantidad de Tissue-Tek II OCT-compound y a continuación se obtienen cortes seriados de 12 a 15 micrómetros de grosor a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras comprobar por medio de la tinción rápida de hematoxilina-eosina la orientación transversal de las fibras, así como la correcta realización de la congelación, se obtienen de cada bloque los cortes seriados, que son fijados en portaobjetos, y en los cuales se realizan las siguientes tinciones:

- Hematoxilina-eosina.
- Miosín adenosín trifosfatasa (miosín-ATPasa).
- Nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolium reductasa, (NADH-TR).
- Esterasa.
- Inmunoperóxidasa.

3.2.7.2.2. Técnica de hematoxilina-eosina

Se ha seguido la técnica desarrollada por Dubowitz y Brooke (1973). Con esta técnica se observan los núcleos azules, el citoplasma de las fibras rosa y el tejido conectivo de color más claro. Una vez realizados los cortes nos permite en poco tiempo asegurarnos de la correcta orientación de los mismos, así como del estado de las fibras.

Soluciones

- Eosina amarillenta al 1%.
- Hematoxilina de Carazzi:

Hematoxilina	0,50 g
Iodato potásico	0,10 g
Alumbre potásico	25 g
Glicerina	100 cc
Agua destilada	400 cc

Preparación de la hematoxilina

Se ponen a hervir 200 cc de agua destilada junto con el alumbre, se retira del fuego y se añade la hematoxilina, agitando hasta que se disuelva completamente, se añade después el iodato potásico y el resto del agua. Por último se añade la glicerina y se deja enfriar. No necesita maduración.

Método

1. Hematoxilina de Harris durante 3-6 minutos.
2. Lavar con agua corriente.
3. Eosina al 1% durante 1 minuto.
4. Deshidratar en alcohol (70%, 95% y absoluto).
5. Aclarar con xilol.
6. Montar en entellan.

3.2.7.2.3. Técnica de miosín-adenosín-trifosfatasa (ATPasa)

Las técnicas son las descritas por Padykula y Herman, (1955b); Guth y Samaha, (1969).

Fundamento

En las distintas especies cada músculo presenta una combinación óptima en sus rangos de labilidad de pHs que se relaciona con una mayor o menor actividad miosin-ATPasa (Müntener, 1979). Ocurre lo mismo con la temperatura del medio de preincubación que puede así mismo, cambiar el patrón histoquímico de tinción de un músculo (Guth y Samaha, 1970). Debido a dichos factores se realizó un análisis previo.

Para ello se toman una colección de cortes seriados y se preincuban en una serie de valores de pHs comprendidos entre 3,8 a 4,9 y desde 9,4 a 10,2, con intervalos de una décima de unidad de pH, siguiendo las propuestas de Morales (1989). La combinación óptima de los valores de pH del medio de preincubación, definida como aquella que proporciona el mayor contraste para la diferenciación de los tipos de fibras, resultó ser la de pH = 4,6. En el presente estudio hemos utilizado los siguientes valores de pH para la técnica de miosín-ATPasa: alcalino 9,4 y ácidos 4,0 y 4,6.

Mediante la tinción con preincubación a pH 9,4 se diferencian con claridad dos tipos de fibras a las que denominamos fibras tipo I (alcalino-lábiles, claras) y fibras tipo II (alcalino-estables, oscuras).

Tras preincubación a pH 4,6 diferenciamos fibras tipo I (ácido-estables, oscuras), tipo IIA (ácido-lábiles, claras) y tipo IIB (ligeramente ácido-lábiles, intermedias).

Soluciones

Tampón Barbital Acetato:

Solución A:

Acetato-sódico 4,857 g

Barbital-sódico	7,357	g
Agua destilada	250	cc

Solución B:

HCl	0,77	cc
Agua destilada	250	cc

Preincubación a pH 9,4:

Barbital-sódico 0,1 M	20	cc
Cloruro cálcico 0,18 M	10	cc
Agua destilada	70	cc
Ajustar el pH a 9,4		

Mezcla para pH 4,6

Solución A	50	cc
Solución B	101,5	cc
Cloruro sódico al 8,5%	20	cc
Completar con agua destilada hasta 250 cc y ajustar el pH a 4,6		

Mezcla para pH 4,0

Solución A	50	cc
Solución B	117,5	cc
Cloruro sódico al 8,5%	20	cc
Completar con agua destilada hasta 250 cc. y ajustar el pH a 4,0		

Incubación: Se toman 30 cc de la solución anterior y se añaden 75 mg de ATP. Se ajusta el pH a 9,4.

*Método***1. Pre-incubación:**

- **pH 9,4** 5 minutos.
- **pH 4,6** 15 minutos.
- **pH 4,0** 15 minutos.

2. Lavar en solución a pH 9,4

3. Incubar en solución de incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente.

4. Hacer tres lavados de 5 minutos cada uno en cloruro cálcico al 1%.

5. Hacer varios lavados con barbital sódico 0,01 M.

6. Lavar con agua destilada.

7. Lavar en cloruro de cobalto (CoCl₂) al 2% durante 5 minutos.

8. Cinco a diez pases en barbital sódico 0,01 M.
9. Lavar en agua corriente.
10. Pasar por sulfuro amarillo de amonio al 2% de 20 a 30 segundos.
11. Lavar en agua corriente durante 10 minutos.
12. Deshidratar en batería de alcoholes.
13. Aclarar con xilol.
14. Montar en entellan.

3.2.7.2.4. Técnica de la nicotinamida-adenín-dinucleótido-tetrazólium-reductasa (NADH-TR)

Se siguió el proceso propuesto por Dubowitz y Brooke (1973).

Fundamento

La oxidación de las coenzimas NADH y NADPH puede ser catalizada por flavín enzimas, llamadas antes diaforasas. Estas, toman un hidrógeno de forma reversible y lo transfieren a varios aceptores, incluyendo algunos sintéticos como el azul de metileno, ferricianida y las sales tetrazólicas. Las flavín-enzimas que reducen las sales tetrazólicas se llaman tetrazolium-reductasas. Estas son muy eficientes en la oxidación de las coenzimas reducidas las cuales no pueden reducir las sales tetrazólicas directamente a pH (7,2-7,4) al que tienen lugar las reacciones histoquímicas de la mayoría de las deshidrogenasas. El pH de la reacción resulta pues crítico, dado que a un pH demasiado alto (por encima de 8) las coenzimas reducidas pueden reducir lenta y directamente a las sales tetrazólicas.

Estas reductasas están presentes en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico, y reflejan la capacidad de regeneración de las coenzimas mediante las reacciones de oxidación intracelular. La NADH-TR se utiliza frecuentemente como un marcador enzimático mitocondrial.

Soluciones

Medio de incubación:

Tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4.	10	ml
Nitro blue tetrazolium (NTB)	10	mg
NADH	8	mg

Glicerina de Jelly:

Gelatina	10	g
Agua destilada	60	ml

Fenol 0,25 g

Método

1 Meter los cortes en el medio de incubación durante 35 minutos a 37 °C.

2 Pasar acetona en concentraciones ascendentes: 30%, 60%, 90%.

3 Montar en glicerina de Jelly.

Mediante esta técnica, diferenciamos fibras SO (de intensa reacción oxidativa), fibras FOG (de moderada reacción oxidativa) y fibras FG (de ligera reacción oxidativa). El tipo FI (fibras indefinidas de intensa reacción oxidativa). que por sus propiedades podríamos equiparar a las IIC (escasas en número, debido a que se trata de animales adultos), tienen una reacción oxidativa intensa, parecida a la que presentan las fibras SO; por ello, su posible presencia queda anexionada a la población de fibras SO. Dado que a veces resulta comprometida y subjetiva la diferenciación por esta técnica entre fibras de intensidad intermedia (FOG) y alta (SO), y guiados por los postulados por Snow y Guy (1980), todas ellas se consideran como de alta intensidad de tinción, estableciendo el porcentaje de fibras FOG indirectamente según la ecuación:

$$\%FOG = 100 - (\%SO + \%FG).$$

Siendo: % SO = Porcentaje de fibras de tipo I

% FG = Porcentaje de fibras con baja reacción oxidativa (NADH - TR), fibras de tipo IIb.

3.2.7.2.5. Técnica de la esterasa

Las esterasas son un grupo de enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar ésteres, y pueden clasificarse en no específicas, específicas y lipasas. Existe un gran solapamiento en cuanto a los sustratos sobre los que actúan y diversos tipos de esterasas pueden hidrolizar un mismo sustrato, haciendo estas clasificaciones aún más complicadas. Cuando se utiliza como sustrato un éster simple, como el naftil acetato, las enzimas responsables de su hidrólisis las denominamos esterasas no específicas. Debido al considerable solapamiento en la actividad, esterasas más específicas tales como colinesterasas y lipasas son también capaces de hidrolizar estos ésteres simples.

Se siguió el método descrito por Davis y Ornstein (1959), citado por Dubowitz y Brooke, (1973), basado en la utilización de naftil acetato, como sustrato, y parasosanilina como agente acoplado, que forma una sal insoluble. Esta técnica tiene la ventaja de que permite la deshidratación en alcohol y xilol para su posterior montaje en resinas sintéticas.

Soluciones

- 1 Parasosanilina-HCl 2 g (calentar ligeramente, enfriar y filtrar)
- 2 Nitrito sódico al 4%
- 3 Fosfato sódico (NaH_2PO_4) 0,2 M
- 4 -naftil acetato 50 mg en 5 ml de acetona pura

Medio de incubación

Mezclar 0,4 ml de la solución 1 con 0,4 ml de la solución 2. Dejar reposar durante 2 minutos y añadir: 7,25 ml (de la solución 3), 0,25 ml (de la solución 4) y 2,5 ml de agua destilada. Ajustar a pH 7,4 y filtrar con papel Watmann nº 4.

Método

1. Incubar en el medio anterior durante 1 hora.
2. Lavar con agua destilada.
3. Deshidratar en la batería de alcoholes.
4. Aclarar con xilol.
- 5 Montar en Entellan.

El resultado visual de la tinción es una gradación de color desde un marrón rojizo a amarillo según sea la actividad esterasa de cada fibra, apreciándose tres intensidades de color distintas, que se relacionan directamente con el tipo de fibra de la siguiente forma: Tipo I coloración fuerte, IIA coloración intermedia y IIB claras.

3.2.7.2.6. Técnica de la inmunoperoxidasa indirecta

Utilizamos el anticuerpo antimiosina rápida: Anti-Mouse IgG (Fab specific, Sigma), por lo tanto se une a las fibras musculares tipo II, dejando sin reacción las de tipo I. De esta forma podemos en la misma sección comparar y comprobar que realmente identificamos por medio de la ATPasa los tipos de fibras básicos.

Soluciones

Solución de PBS para mamíferos.

Na_2HPO_4 anhidro	1,15	g
KH_2PO_4	0,2	g
NaCl	8	g
Agua	Hasta	100 ml

Comprobar que el pH esta entre 7,4 y 7,6

En el momento de usar se diluye la solución de PBS, 1:10 en agua destilada.

Solución I.

A: Tampón Tris-HCl (0,05 M), pH 7,6

B: Diluir 50 mg de Diaminobenzidina (DAB) en 10 ml de la solución A.

Se preparan alícuotas de 500 μ l y se guardan en ependorff a -20 °C.

Inmediatamente antes de usar:

1. Añadir 4,5 ml de A a una alícuota de B.
2. A 405 μ l de H₂O destilada, añadir 45 μ l de agua oxigenada concentrada.

Solución I uso: Mezclar 22,5 μ l de la solución 2 con la solución 1.

Solución II:

CuSO₄ al 5% en NaCl al 0,9%

Método

1. Cortes musculares de 12 micras.
2. Dejar secar durante una hora a temperatura ambiente.
3. Fijar durante 5 minutos en acetona fría a temperatura ambiente.
4. Dejar secar durante 30 minutos.
5. Inhibir la peróxidasa endógena por incubación en H₂O₂ al 0,3% en metanol durante 10 minutos.
6. Lavar tres veces en PBS, 5 minutos cada una.
7. Incubar con el anticuerpo primario, a la concentración adecuada en PBS, durante una hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
8. Lavar tres veces en PBS, 10 minutos cada una.
9. Incubar con el anticuerpo conjugado con peroxidasa, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
10. Lavar tres veces en PBS, 10 minutos cada una.
11. Incubar con la solución I de 6 a 20 minutos. Controlar la coloración al microscopio.
12. Lavar varias veces con agua corriente.
13. Incubar durante 5 minutos en la solución II, si se desea aumentar el contraste.
14. Contrastar los núcleos con hematoxilina 3 minutos.
15. Deshidratar en batería de alcoholes ascendentes.
16. Aclarar con xilol.
17. Montar en entellan.

3.2.7.3. Estudio histoquímico cuantitativo y morfométrico

3.2.7.3.1 Determinación de áreas y perímetros

Se realizaron 20 cortes seriados (dos cortes por porta) a partir de los músculos congelados (sóleo, gastrocnemio y plantaris) para realizar las distintas tinciones. De esta forma obtuvimos un total de 10 portaobjetos para cada músculo distribuyéndose para las distintas reacciones de la siguiente manera: 2 para ATPasa pH 4,6; 2 para ATPasa pH 4,2; 2 para ATPasa pH 4,0; 2 para NADH-TR; 1 para Esterasa y 1 para la inmunoperoxidasa.

Sobre los cortes teñidos para la determinación ATPasa con preincubación a pH 4,6 (en la que se visualizan los tres tipos de fibras) se realizaron las medidas de las áreas de los distintos tipos de fibras presentes en los músculos estudiados. Para ello fueron obtenidas fotografías con una cámara fotográfica NIKON, acoplada a un microscopio óptico Optiphot (NIKON), sobre las cuales, a través de una tarjeta digitalizadora (Genitizer-GT-1212B) conectada al programa de ordenador Sigma-Scan. medimos las áreas, y perímetros (Fouces y cols., 1993).

En cada preparación se fotografiaron ambos cortes, obteniéndose 2 fotografías para el sóleo, 2 para el plantaris y 5 para el gastrocnemio (2 porción roja, 2 porción mixta y 1 para la porción blanca). En cada músculo, y en su caso porciones musculares, se realizó un estudio de 100-150 fibras en la muestra según el método propuesto por Blomstrang y Ekblom, (1982) y Shorey y Cleland, (1983). El número de fibras total para cada grupo fue de 600-900, si tenemos en cuenta que en cada grupo se analizaron seis animales.

3.2.7.3.2. Determinación del porcentaje fibrilar

Para el cálculo del porcentaje fibrilar se realizaron contajes directos sobre las muestras con ayuda del microscopio y la cámara clara. La tinción ATPasa a pH 4,6 nos sirve de base para la diferenciación de los tres tipos de fibras (I, IIA y IIB) mientras que las fibras IIC se cuantificaron a partir de la preincubación a pH 4,2. Aproximadamente se visualizaron 20 campos para cada músculo y tratamiento.

3.2.7.3.3. Determinación de la capilaridad

El estudio de la capilaridad se realizó en las muestras obtenidas tras la tinción ATPasa con preincubación a pH 4. A través de las preparaciones podemos obtener la densidad capilar (capilares/ mm²), y los capilares por fibra. Para ello se delimitó un área 0,16 mm² con ayuda de un portaobjetos reglado. Sobre esta área se visualiza la muestra con ayuda de la cámara

clara y se cuentan los capilares y el número de fibras. Se determinaron en un área total de $0,48 \text{ mm}^2$ en cada muestra.

3.2.7.3.4. Otras determinaciones

Con el objeto de evidenciar cambios en el metabolismo oxidativo de los tipos de fibras en la preparación obtenida tras la tinción, NADH-TR, se determinó el porcentaje de las fibras FG, mediante cuantificación directa sobre la muestra a través de una cámara clara. En el caso de la porción blanca del gastrocnemio, existen fibras de tipo IIB oxidativas cuya presencia ha sido descrita con anterioridad por Rivero y cols., (1993) y por ello son objeto de estudio en la presente memoria.

Las preparaciones obtenidas tras la tinción mediante la técnica de las esterasas no específicas nos permiten obtener los porcentajes de esterasa positiva y negativa en función de la intensidad de tinción en las distintas fibras, por medio del conteo directo sobre las preparaciones a través del microscopio y con ayuda de la cámara clara.

Por último la inmunoperoxidasa nos permite diferenciar de forma específica la miosina lenta de la miosina rápida, diferenciando así las fibras tipo I (reacción negativa) frente a las tipo II (reacción positiva). Esto nos permite determinar la fiabilidad de la técnica de la ATPasa, para diferenciar las fibras tipo I y las de tipo II.

3.2.7.4. Tratamiento estadístico

El estudio estadístico de los resultados se realizó mediante el programa CSS Statistica versión 4.5 y Microsoft Excel 5.0 para Windows, en un ordenador PC compatible.

Se calculó la media y la desviación estándar para cada muestra y cada uno de los factores analizados. La significación estadística se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA/MANOVA) utilizando el test de Newman-Keuls.

Para las fotografías que acompañan la presente memoria se seleccionaron los campos más representativos.

3.2.7.5. Error metodológico

La distribución fibrilar en los músculos de rata es heterogénea con un importante grado de compartimentación, lo que obliga a considerar metodológicamente porciones de músculos, niveles y profundidades constantes en la toma de muestras. Sin embargo, estos aspectos no están netamente delimitados, introduciéndose, en el estudio de una determinada

porción muscular, un error inherente que ha de valorarse como "metodológico", capaz de influir en los resultados (Armstrong y Phelps, 1984).

La técnica histoquímica empleada, puede ser también un origen de error metodológico. A este respecto coinciden la mayoría de los autores en resaltar la subjetividad de la identificación fibrilar por técnicas oxidativas (Gollnick y cols., 1973b; Armstrong y Phelps, 1984). Así, ya se apuntó como las fibras IIB poseen un rango de actividad oxidativo que puede ir desde un extremo a otro, como un punto de demarcación confuso (Spamer y Pette, 1980; Hintz y cols., 1984), que incluso se acentúa en las fibras musculares durante el entrenamiento (Gollnick, 1982; Hikida y cols., 1983; Peña, 1984; Morales, 1989). A este segundo respecto, las técnicas inmunohistoquímicas se han utilizado en la presente memoria con el fin de confirmar las determinaciones histoquímicas (LÁMINA 6).

4. Resultados y discusión

4.1. Evolución del peso

La evolución del peso de los animales en los distintos grupos a lo largo del experimento se muestra en la figura 1. En ella podemos apreciar la existencia de dos comportamientos diferentes, por un lado los grupos que toman etanol, con pesos inferiores a lo largo de los tres meses, con respecto a los otros grupos que no toman etanol y que presentan los pesos mayores. Este resultado está de acuerdo con los valores obtenidos por Preedy y Peters, (1987 y 1988); Trounce y cols., (1990); Cook y cols., (1992), que apoyan un menor desarrollo en los animales que ingieren etanol. El descenso en el peso corporal puede deberse al daño que el etanol ejerce sobre la síntesis de proteínas (Cook y cols., 1992), de hecho en la tabla III se puede ver que los valores más bajos en las proteínas plasmáticas se dan en los grupos alcoholizados. El efecto del ejercicio sobre el peso no indujo cambios hasta el día 70 del experimento, a partir del cual se aprecian sus efectos negativos sobre el peso de los animales, no siendo estas variaciones significativas respecto al control. Similares resultados han sido publicados por Baldwin y cols., (1972) con un protocolo de ejercicio semejante. La pérdida de peso debida al ejercicio, al final del experimento coincide con la caída de los triglicéridos en las ratas sometidas a entrenamiento al final del 3^{er} mes del experimento (tabla III). Debido a la interacción de ambos factores, al final del experimento el peso de las ratas sometidas a entrenamiento y alcoholizadas es más bajo, (336 ± 32 g), siendo este valor menor de forma significativa respecto al control (416 ± 37 g) (figura 2).

En la tabla I se muestran los pesos de los distintos músculos estudiados, así como del hígado al final del experimento. Podemos apreciar como el peso de los músculos solo varió por efecto del ejercicio, siendo únicamente significativamente menor el valor correspondiente al sóleo.

4.2. Consumo de etanol

En la figura 3 se recoge el consumo de etanol en el agua de bebida a lo largo de los tres meses, siendo el primer mes el de mayor consumo para ambos grupos. En los dos meses siguientes el consumo disminuye estabilizándose hasta el final del tratamiento obteniéndose en el último mes una media de 100 ± 15 ml para el grupo sedentario y 104 ± 15 ml para el entrenado.

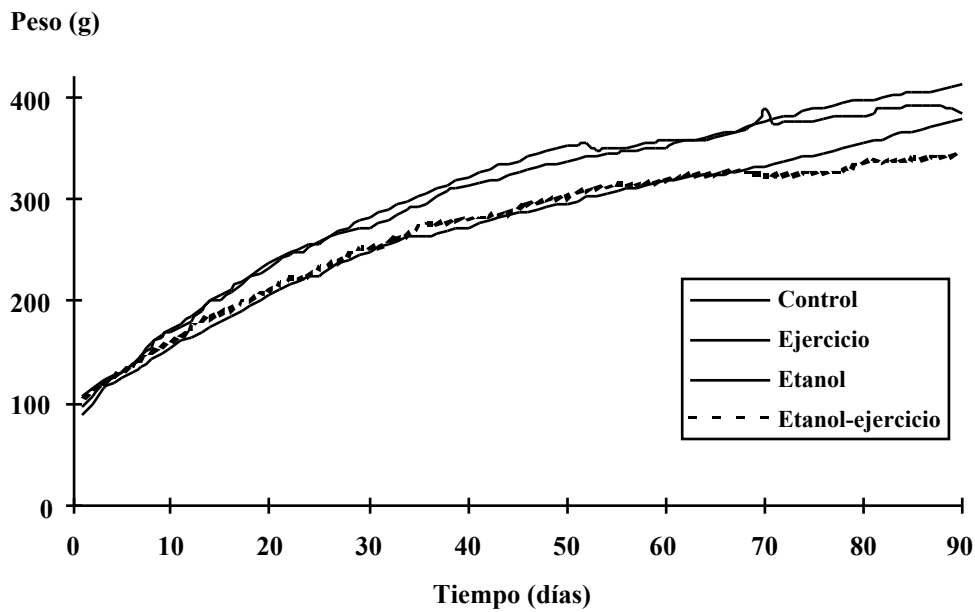
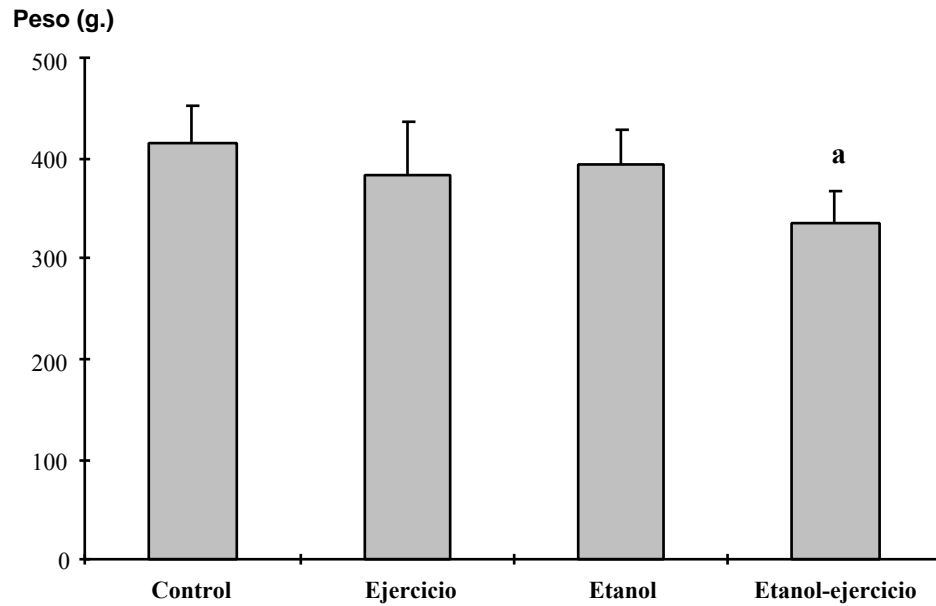


Figura 1. Evolución del peso corporal (g) en los distintos grupos a lo largo de los tres meses del experimento.



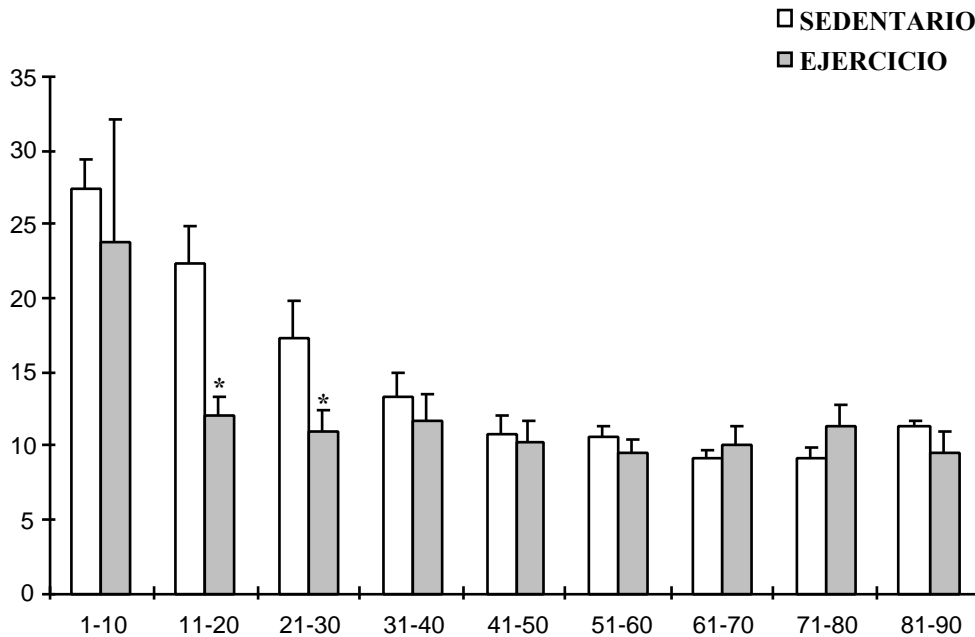
a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control del grupo etanol-ejercicio.

Figura 2. Peso (g) medio de los animales en los distintos grupos al final del experimento.

	Total	Hígado	Plantaris	Gastrocnemio	Sóleo
Control	416 ± 37	32,3 ± 3,88	0,88 ± 0,08	5,02 ± 0,46	0,40 ± 0,04
Etanol	395 ± 35	33,3 ± 1,53	0,91 ± 0,03	5,20 ± 0,30	0,43 ± 0,04
Ejercicio	383 ± 55	30,39 ± 3,06	0,86 ± 0,07	4,71 ± 0,40	0,36 ± 0,03a
Etanol-Ejercicio	336 ± 32	32,9 ± 1,82	0,95 ± 0,06	5,24 ± 0,36	0,43 ± 0,04

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control.

Tabla I. Pesos de los animales (g), peso del hígado y los distintos músculos estudiados (g/peso total x 1.000) ± DS al final del experimento.



* Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control.

Figura 3. Consumo de etanol medio (ml/peso x 100) durante periodos de diez días en el grupo sedentario y en el grupo que realiza ejercicio a lo largo del experimento.

4.3. Parámetros bioquímicos en sangre

4.3.1. Niveles de glucosa y triglicéridos

Los resultados obtenidos referentes a los niveles de glucosa plasmática no presentan variaciones significativas a lo largo del experimento en ningún tratamiento (tabla III).

Se ha descrito que la administración de etanol en humanos puede producir hipoglucemia o hiperglucemia dependiendo de los niveles de glucógeno hepáticos. La hipoglucemia se produce por un descenso de la gluconeogénesis hepática como resultado del aumento en la relación NADH/NAD, consecuencia del metabolismo del etanol (Dornhorst y Ouyang, 1971; Lieber y cols., 1978; Forman, 1988). El incremento del cociente también disminuye la concentración de piruvato y oxalacetato, precursores del fosfoenol piruvato. Este compuesto es un sustrato importante cuya concentración es clave en la gluconeogénesis. La hiperglucemia se puede producir por una disminución de la captación de glucosa por tejidos periféricos o en situación de administración aguda por un incremento en la actividad glucógeno fosforilasa. Sin embargo en nuestros resultados no se producen diferencias significativas en los niveles séricos de glucosa en relación al consumo de etanol.

El entrenamiento induce adaptaciones celulares que aumentan la utilización de glucosa y de glucógeno (Brooks y Mercier, 1994). Esto se reflejaría en un descenso de los niveles séricos de glucosa, si bien hay que tener en cuenta el estado nutricional del animal así como el grado de entrenamiento. Nuestros resultados muestran una tendencia a disminuir los niveles de glucosa con el ejercicio (101 ± 13 mg/dl vs 138 ± 18 mg/dl del grupo control) que podría deberse a un aumento en la captación muscular. Esto se ve apoyado por un aumento en la actividad hexoquinasa del músculo en respuesta al entrenamiento (tabla XII).

En cuanto a los triglicéridos la administración de etanol no modificó el nivel de los mismos. Se ha descrito que el consumo crónico de etanol produce un aumento en los niveles plasmáticos de triglicéridos (Mezey, 1985), si bien estos resultados se aprecian en pacientes con elevadas ingestas de alcohol durante periodos largos (Castelli y cols., 1977). Nuestros resultados indicarían que el grado de alcoholización de los animales no es suficiente ya que no se han producido variaciones en la concentración de triglicéridos en sangre.

Varios estudios han puesto de manifiesto un descenso en los niveles séricos de TG en respuesta al ejercicio, lo que esta de acuerdo con nuestros resultados (tabla II). Como podemos apreciar se produce un descenso significativo en los niveles séricos de triglicéridos al final del tercer mes de entrenamiento. Los valores descienden a 90 ± 27 mg/dl vs 190 ± 27 mg/dl en el grupo control. Las causas principales de este descenso pueden ser una menor secreción hepática, o una menor eficiencia hepática de utilización de sustratos para la síntesis de triglicéridos. Mondon y cols., (1984), mostraron que la secreción de triglicéridos era semejante en ratas entrenadas y controles por lo que los bajos niveles séricos de debidos al ejercicio parecen estar más ligados a una reducción en la disponibilidad de sustratos por el hígado. El grupo que consume etanol y realiza ejercicio presenta el mismo comportamiento.

Hartung y cols., (1993), han señalado que el ejercicio aumenta el aclaramiento de triglicéridos en sangre en individuos a los que se les administra etanol, disminuyendo la concentración sérica de triglicéridos.

		CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
Glucosa	1° Mes	124 ± 8	100 ± 34	123± 19	105± 22
	2° Mes	123 ± 28	164 ± 43	106± 16	111± 22
	3° Mes	138 ± 18	120 ± 40	101± 13	109± 17
Triglicéridos	1° Mes	177 ± 47	164 ± 54	138± 26	129± 48
	2° Mes	139 ± 30	168 ± 80	130± 45	104± 35
	3° Mes	190 ± 27	153 ± 73	90± 27a	97± 17b

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

Tabla II. Niveles medios y desviaciones estándar (DS) de glucosa y triglicéridos (mg/dl) a lo largo del experimento.

4.3.2. Niveles de proteínas totales y urea

Los niveles de proteínas totales y urea en sangre se muestran en la tabla III.

Los grupos no muestran diferencias significativas en los niveles séricos de proteínas en relación con los tratamientos. En todos ellos podemos ver un incremento de las proteínas totales a lo largo de los tres meses de estudio, pero este efecto es debido al crecimiento de los animales (Martin, y cols., 1977).

En cuanto a la concentración de urea, podemos apreciar variaciones tanto con el entrenamiento como con el alcohol, al primer mes del experimento. Los valores alcanzados son $40,3 \pm 2,3$ mg/dl en el grupo ejercicio y $48,5 \pm 4$ mg/dl en el grupo etanol ejercicio siendo $34,7 \pm 3,3$ mg/dl en el control.

Con el ejercicio se producen una serie de alteraciones de la función renal, que afectan a la excreción de sodio, cloro, urea, las cuales se ven disminuidas. Esta reducción en la tasa de filtración glomerular podría ser la responsable de los niveles detectados de urea a lo largo del experimento.

La administración de etanol afecta a la síntesis de proteínas en varios órganos. El NADH generado como resultado del metabolismo del etanol juega un importante papel en alguno de los procesos inhibitorios de la síntesis proteica. Sin embargo el efecto de la administración crónica de etanol sobre la síntesis proteica es muy variable, pudiendo potenciarla, inhibirla o no modificarla (Pösö, 1987). Son frecuentes en alcohólicos bajos niveles de proteínas, atribuyéndose a una síntesis reducida debida al daño hepático (Rothschild y cols., 1985).

El etanol provoca un aumento en la excreción urinaria de nitrógeno, urea y ácido úrico (Siamak y cols., 1992). Este aumento de la excreción en humanos se asocia con un balance negativo de nitrógeno y pérdida de peso. Estudios en ratas muestran que alcohol administrado de forma crónica descende la síntesis de proteínas debido a una menor eficiencia en la utilización del nitrógeno. Nuestros resultados muestran que el etanol no produce variaciones en cuanto a los niveles de proteínas plasmáticas, mientras que los niveles de urea sí se ven afectados.

El aumento en la concentración de urea por efecto del etanol y el ejercicio es el más notable, siendo distinto significativamente durante los tres meses del experimento. Ambos efectos, el aumento de la excreción de nitrógeno por el alcohol unido al fallo renal asociado al ejercicio, serían responsables de este resultado.

		CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
Proteínas	1º Mes	7,00± 0,28	6,73± 0,32	6,82 ± 0,40	6,55± 0,40
	2º Mes	7,02± 0,30	6,97± 0,39	7,27 ± 0,48	7,10± 0,41
	3º Mes	7,43± 0,18	7,22± 0,35	7,67 ± 0,21	7,30± 0,28
Urea	1º Mes	34,7± 3,3	24,7± 5,0 ^a	40,3 ± 2,3 ^a	48, 5± 4,0 ^{bc}
	2º Mes	36,0± 5,4	52,7± 8,1 ^a	37,2 ± 4,3	44,7± 5,3 ^{bc}
	3º Mes	42,0± 6,2	40,2± 3,5	41,2 ± 4,1	48,0± 3,2 ^{bc}

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla III. Valores medios y las correspondientes desviaciones estándar de proteínas totales (g/dl) y de urea (mg/dl) en el suero de los animales durante el primer, segundo y tercer mes del experimento.

4.4. Parámetros enzimáticos en sangre

Como respuesta generalizada las actividades de distintas enzimas en el suero no muestran aumentos proporcionales con el nivel de ejercicio, algunas como la alanín-transaminasa (ALT) aumenta sólo de forma moderada tras ejercicio prolongado, mientras que otras como fosfatasa alcalina (PAL) y - glutamiltransferasa (GGT) son influenciadas solo en caso de ejercicios muy prolongados. Los mayores incrementos descritos los muestra la creatín- fosfoquinasa (CPK) que puede aumentar su actividad hasta 10-20 veces, mientras que en las mismas condiciones la aspartato-transaminasa (AST) y lactato deshidrogenasa (LDH) aumentan sólo de 2-8 veces. Estas diferencias pueden deberse a su distinto origen tisular así como a la diferente localización intracelular. Las enzimas con mayores actividades en el músculo (CPK) aumentan más que las enzimas de origen hepático, y los niveles séricos de

enzimas de localización citoplasmática aparecen más elevados cuando se comparan con los de localización mitocondrial.

De acuerdo con esto Van Der Meulen y cols., (1991) muestran un aumento en el suero de las actividades CPK y LDH. Este aumento se correlaciona con la duración del ejercicio, siendo mayor el incremento en las ratas ejercitadas durante 2,5 horas frente a las que corrieron 1,5 horas. Estos autores concluyen que el aumento de las enzimas séricas no refleja necesariamente daño estructural, aunque si variaciones en la permeabilidad de la membrana celular. Apple (1986) en deportistas entrenados que realizan 80-160 Km por semana, encontró un incremento en la actividad CPK de hasta 12 veces y en las actividades AST y LDH de 2 veces, mientras que la ALP, ALT y -GT no variaron.

La microscopía electrónica ha revelado la existencia de daño miofibrilar con ruptura y distorsión en las fibras, en particular a nivel de las líneas Z. Esto explicaría los incrementos en la actividad de determinadas enzimas en atletas sometidos a ejercicios prolongados y fuertes. El menor incremento producido tras ejercicio de menor duración como carreras de 21 Km, probablemente indica cambios en la permeabilidad de la membrana sin daño celular muscular. La aparición de fatiga muscular va acompañada de incrementos en los valores séricos de CPK lo que implica una permeabilidad alterada en el músculo.

La rhabdomiolisis ocurre tras el ayuno o tras el ejercicio prolongado especialmente si se consumen dietas pobres en carbohidratos, y se ha sugerido que la causa puede relacionarse con el vaciamiento de glucógeno muscular.

Esta hipótesis se ve apoyada con la rhabdomiolisis que ocurre tras el ejercicio en personas con deficiencia en glucógeno fosforilasa, en las que la glucogenolisis esta alterada. Otro factor que corrobora este hecho es que la rhabdomiolisis aumenta sólo en carreras de más de 21 Km ya que el glucógeno en esta situación no se agota completamente. Esto supone que durante el ejercicio para mantener la función celular normal es necesaria una continua glucogenolisis.

4.4.1. Niveles de transaminasas

En la tabla IV aparecen los datos de las concentraciones en suero de las transaminasas: ALT (GPT), AST (GOT) y GT.

En nuestros resultados los valores de la ALT que mas se han incrementado corresponden a los animales que han realizado ejercicio que presentan unos valores de $53,8 \pm 8,8$ U/l y $56,7 \pm 6,8$ U/l en el segundo y tercer mes de experimento, aunque dichos

incrementos no han sido significativos. La actividad de la ALT aumenta sólo de forma moderada tras el ejercicio muy prolongado (Shapiro y cols., 1972). Sin embargo otros autores no sólo no detectan este incremento, sino que incluso describen descensos de esta actividad. Así la ALT, desciende en atletas sometidos a 15 minutos de ejercicio, y también en individuos sedentarios tras realizar ejercicio más extenuante.

En cuanto a los niveles de AST y -GT han aumentado de forma significativa por efecto del ejercicio con respecto al control al final del experimento. Algunos autores han encontrado un aumento en las concentraciones plasmáticas de AST en sujetos entrenados, este aumento varía entre un 10-90% dependiendo de la intensidad y duración del ejercicio y se produce 24-48 horas después del ejercicio (Ahlborg y Brohult., 1967; Siest y Galteau., 1974).

La mayoría de las enzimas, cuyo origen principal es el músculo esquelético, el corazón y el hígado, muestran incrementos con el ejercicio. No se ha demostrado la actividad -GT en músculo, aunque esta presente en hígado y riñón (Haralambie, 1976). No obstante en cuanto al efecto del alcohol la actividad -GT en suero no se modifica en voluntarios humanos después de dosis agudas (Luchi y cols., 1978; Clark y cols., 1982; Devgun y cols., 1985). Sin embargo, la administración crónica produce un aumento de la actividad -GT en animales (Gadeholt y cols., 1980) y en el hombre (Shaw y Lieber, 1980). Este aumento puede relacionarse con varios factores: inducción hepática producida por el etanol, un incremento en su síntesis como respuesta a la colestasis, o por un aumento en la permeabilidad de las membranas del hepatocito con liberación de las enzimas. Numerosos estudios muestran que la elevación de los niveles no se produce de forma homogénea en todos los individuos.

Este marcador de alcoholismo es más fiable en pacientes con daño hepático, y con ingestión de alcohol reciente. Boyd, (1983) señala que en rata al ser muy bajos los niveles séricos de -GT, (e incluso no detectables) pueden no ser un diagnóstico real. No obstante, nuestros resultados muestran aumentos significativos en el grupo etanol, en el primer y tercer mes, con respecto al grupo control.

Algunos estudios muestran que la administración crónica de etanol puede elevar los niveles de transaminasas tanto en primates como en humanos (Lieber y cols., 1975; Shaw y Lieber, 1980). Aunque estudios posteriores sugieren que la magnitud de este aumento está en relación con el daño hepático (Nishimura y cols., 1980). La sensibilidad de estos marcadores es un 35% menor que la sensibilidad de la -GT siendo la aspartato amino-transferasa (AST) mejor indicador del daño hepático que la alanina amino-transferasa (ALT). El factor que se utiliza en humanos para detectar daño hepático es la relación AST/ALT siendo esta relación mayor de 2 para los casos de enfermedad hepática alcohólica. Este aumento puede deberse a una mayor abundancia de AST en las mitocondrias de los hepatocitos. El etanol puede producir daño selectivo mitocondrial, produciendo una liberación de AST y la consiguiente elevación de la relación AST/ALT.

Otra posible causa es una deficiencia de piridoxal fosfato, muy común en los alcohólicos. Esta deficiencia produce una pérdida de actividad ALT con el incremento de la relación anteriormente mencionada. En nuestros resultados la AST se elevó de forma significativa sólo al tercer mes de tratamiento mientras que la ALT no se modificó de forma significativa.

Teniendo en cuenta los niveles de transaminasas detectados tras el periodo de alcoholización no podemos considerar la existencia de daño hepático producido por la ingestión crónica de etanol.

		CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
ALT (U/l)	1º Mes	48,3 ± 6,1	46,0 ± 9,1	46,3 ± 6,3	43,5 ± 3,4
	2º Mes	45,33 ± 8,29	51,6 ± 10,31	53,8 ± 8,76	43,5 ± 9,54
	3º Mes	51,4 ± 7,77	46,6 ± 8,71	56,7 ± 6,77	46,0 ± 6,32
AST (U/l)	1º Mes	201 ± 29	249 ± 24	204 ± 53	273 ± 24 ^c
	2º Mes	246 ± 42	219 ± 19	275 ± 35	264 ± 22
	3º Mes	194 ± 17	260 ± 22 ^a	281 ± 31 ^a	268 ± 35
-GT (U/l)	1º Mes	3,00 ± 2,00	4,50 ± 1,38 ^a	1,67 ± 1,21	2,33 ± 1,51
	2º Mes	1,67 ± 0,82	2,67 ± 1,86	2,67 ± 0,82	1,50 ± 0,55
	3º Mes	1,00 ± 0,63	3,50 ± 1,87 ^a	2,50 ± 0,55 ^a	1,50 ± 0,55 ^b

a Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla IV. Niveles medios (U/l) y DS de las actividades alanín-transferasa (ALT), aspartato-transferasa (AST) y -glutamil transferasa (-GT) en suero.

4.4.2. Nivel de CPK, LDH y PAL

En la tabla V se recogen los resultados correspondientes a valores séricos de creatín-fosfoquinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (PAL).

La liberación de enzimas musculares se utiliza para estimar la cantidad de daño muscular sobre todo en el ejercicio intenso, sobre la base de que esta liberación está en concordancia con el daño muscular producido tras el ejercicio. La CPK es también indicador de daño muscular en animales, así Armstrong (1988) utiliza estos cambios como marcadores del daño muscular al estudiar el efecto del ejercicio en ratas.

Con respecto a la PAL, su amplia distribución tisular (osteoblastos, riñón e intestino de forma mayoritaria), hace que el aumento de la actividad sérica no sea identificativo de daño tisular específico.

En nuestros resultados el valor más alto para la CPK al final del tratamiento lo muestra el grupo alcoholizado, 2.616 ± 419 U/l cuyas diferencias son significativas respecto al control 1.816 ± 209 U/l. No obstante debemos tener en cuenta que esta significación no es debida a un efecto directo del consumo de alcohol, sino al menor valor del grupo control. Además los valores de CPK obtenidos muestran una gran variedad interindividual y las diferencias que aparecen pueden ser debidas a esto.

Un reciente trabajo de Amaladevi y cols., (1995), señala que el alcohol incrementa la liberación de CPK actuando directamente sobre las fibras musculares, especialmente en las fibras oxidativas (tipo I) y que las contracciones musculares repetidas potencian este efecto aumentando el riesgo de rhabdomiolisis en alcohólicos.

En cuanto a los niveles sanguíneos de la LDH, sufren distintas variaciones según el mes de tratamiento existiendo también una gran variación interindividual. Los resultados indican un aumento de forma significativa del grupo etanol frente al grupo control al primer mes, pero ocurre todo lo contrario en el tercero. El ejercicio aumenta los valores de forma significativa al final del experimento. Debemos señalar la existencia de grandes variaciones en las actividades séricas de la enzima LDH. Nicholas y cols., (1967) encontraron dichas variaciones en los niveles enzimáticos de LDH en ratas control, atribuyéndolas tanto a la técnica analítica como a la hemólisis producida. Examinando los resultados el único incremento que podría haber ocurrido lo presentan las ratas que ingieren alcohol y realizan ejercicio durante el primer mes, (8.104 ± 1.667 U/l). Este incremento inicial podría deberse al daño muscular producido por la falta de entrenamiento.

De los resultados obtenidos podemos deducir que ni el ejercicio ni el alcohol en nuestras condiciones experimentales han producido daño tisular, y si se produce es al principio de los tratamientos.

		CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
CPK (U/l)	1º Mes	2.443 ± 557	2.890 ± 523	1.863 ± 371	2.689 ± 411
	2º Mes	2.866 ± 398	2.153 ± 329	2.666 ± 577	2.416 ± 129
	3º Mes	1.816 ± 209	2.616 ± 419 ^a	2.051 ± 167	2.065 ± 392
LDH (U/l)	1º Mes	2.472 ± 648	3.250 ± 889	2.860 ± 360	8.104 ± 1667 ^{bc}
	2º Mes	5.505 ± 484	5.108 ± 432	5.025 ± 210	4.831 ± 371
	3º Mes	3.996 ± 465	2.901 ± 387 ^a	5.074 ± 346 ^a	4.079 ± 350 ^{bc}
PAL (U/l)	1º Mes	218 ± 26,1	246 ± 22,5	217 ± 54,8	220 ± 23,0
	2º Mes	167 ± 28,6	168 ± 33,3	185 ± 12,7	144 ± 13,8
	3º Mes	110 ± 22,8	106 ± 12,4	124 ± 11,5	109 ± 10,3

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla V. Valores medios (U/l) y las correspondientes DS de las actividades creatín-fosfoquinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH) y fosfatasa alcalina (PAL) en suero.

4.4. Parámetros hematológicos

4.4.1. Niveles de hemoglobina, hematócrito recuento e índices eritrocitarios

En la tabla VI se pueden apreciar los valores de hemoglobina, hematócrito y recuento eritrocitario (RBC) en los distintos grupos estudiados al mes, dos meses y los tres meses de tratamiento. Los únicos cambios significativos los muestran los grupos que realizaron ejercicio, en los cuales se aprecian valores inferiores al control al final del primer y tercer mes de tratamiento. Los valores correspondientes al hematócrito fueron $40,0 \pm 3,4$ y $42,0 \pm 2,4$ del grupo ejercicio vs $45,3 \pm 0,4$ y $46,2 \pm 1,1$ del grupo control. El descenso en el número de eritrocitos está de acuerdo con los valores de hemoglobina y hematócrito. El etanol no produce cambios significativos respecto al control. En la tabla VII se muestran los valores de VCM (Volumen Corpuscular Medio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Media) y CHCM (Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media).

Spodaryk y cols (1986) en ratas sometidas a un entrenamiento de 30 días señalan un descenso en los niveles de hematócrito (40% a 30%) y en el recuento eritrocitario ($8,9$ a $6,7$ millones/ mm^3) y un aumento en el número de reticulocitos (0,008 a 0,074%).

El ejercicio físico afecta de distinta forma al valor hematócrito, así la realización de ejercicios intensos produce hemoconcentración debida a la pérdida de volumen plasmático, en cambio cuando se realizan ejercicios de resistencia aeróbicos los valores de hematócrito (y

por tanto viscosidad de la sangre) son mas bajos. Esto se ha descrito tanto inmediatamente después del ejercicio como en reposo (Lapieza y cols., 1988).

Dos posibles causas se hayan implicadas en el descenso de hematócrito durante el ejercicio, la primera descrita como una pseudoanemia se debe a un incremento del volumen plasmático a causa del aumento de la retención de sodio, lo que ocasionaría una reducción en la concentración de hemoglobina o del hematócrito. Por otra parte, existe una hemólisis intravascular fisiológica relacionada con el ejercicio, específicamente unida a las carreras que origina una liberación de hemoglobina. Los datos muestran que esta hemólisis implica la destrucción de un pequeño número de hematíes viejos, que poseen mayor cantidad de creatinina.

Ello provoca un incremento relativo de la concentración de los hematíes más jóvenes, que a su vez ocasiona una elevación de VCM. Nuestros resultados no muestran sin embargo variaciones para el VCM por efecto del ejercicio (tabla VII).

Aunque algunos estudios no han descrito un incremento de la destrucción de hematíes (Brotherhood y Brozobic., 1975) se ha demostrado una reducción característica de la haptoglobina durante el esfuerzo máximo, con una base crónica en los deportistas, lo que sugiere un aumento de la hemólisis (DuFaux y Hoederath, 1981). Con el tiempo esta hemólisis reduciría la cantidad de hierro de los individuos. Se ha sugerido la existencia de variaciones en la fragilidad osmótica eritrocitaria como la causa, pero los deportistas presentan una resistencia eritrocitaria mayor cuando se ha estudiado dicha fragilidad en salino hipertónico. La causa está mas relacionada con la hemoglobinuria inducida por el esfuerzo o la marcha, siendo la lesión mecánica la causa que provoca la fragmentación de los hematíes. Existen además factores adicionales, como la presencia de membranas eritrocitarias rígidas que provocan la eliminación de los hematíes más viejos y la denominada hemoglobinemia, que consiste en un síndrome de microtraumatismos múltiples (Simon, 1991).

La posible reducción y pérdida de eritrocitos se puede demostrar por la presencia de hemoglobina disuelta libre en sangre y orina. La necesaria respuesta fisiológica inherente al descenso de eritrocitos activa la eritropoyetina y esta activación se manifestaría una vez finalizado el ejercicio físico por un aumento en el número de eritrocitos circulantes, que presentaría un máximo dos a tres días después de finalizar el ejercicio.

La administración de etanol no modifica estos parámetros hematológicos en nuestros resultados. Algunos autores, (Lapieza y cols., 1988) señalan que se produce un descenso en los valores de hemoglobina, hematócrito y recuento de hematíes.

La anemia es un hecho común en situación de alcoholismo (Wu y cols., 1975; Heidemann y cols., 1981) La causa más común de esta anemia es una deficiencia de folato

que provoca anemia megaloblástica, asociada a problemas de malnutrición. Las causas de como el alcohol interfiere con el metabolismo del folato permanecen sin clarificar, no obstante el alcohol acelera el desarrollo de la anemia en individuos sin reservas de folato. Otra alteración producida por el consumo de alcohol, es la denominada anemia sideroblástica en la que la utilización del hierro para la eritropoyesis disminuye. Existe un tercer tipo de anemia producida por el consumo de alcohol no asociada a déficits nutricionales es una anemia hemolítica que se produce por efecto tóxico directo del etanol, y se asocia a cirrosis hepática.

En relación con nuestro resultados, de la misma forma que hemos visto que la administración de etanol en nuestras condiciones experimentales administrado al 15% en agua de bebida no produjo pérdida de peso al final del experimento, puede decirse que el etanol no produce carencias nutritivas que se manifiesten a través de un descenso en el número de eritrocitos.

	MES	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL- EJERCICIO
Hemoglobina	1°	15,4 ± 0,1	15,9 ± 0,7	13,9 ± 1,3 ^a	15,4 ± 0,5 ^c
	2°	16,4 ± 0,3	16,5 ± 1,9	16,0 ± 1,0	16,1 ± 0,3
	3°	16,1 ± 0,3	16,1 ± 0,6	14,2 ± 0,8 ^a	15,2 ± 1,0 ^{bc}
Hematócrito	1°	45,3 ± 0,4	46,2 ± 1,9	40,0 ± 3,4 ^a	44,2 ± 1,5 ^c
	2°	48,6 ± 1,4	47,2 ± 3,0	45,7 ± 3,0	45,5 ± 1,4
	3°	46,2 ± 1,1	45,9 ± 2,7	42,0 ± 2,4 ^a	43,5 ± 2,7
RBC	1°	7,6 ± 0,1	7,9 ± 0,2	7,0 ± 0,6 ^a	7,7 ± 0,4 ^c
	2°	8,5 ± 0,3	8,4 ± 0,4	8,1 ± 0,6	8,0 ± 0,2
	3°	8,5 ± 0,3	8,5 ± 0,4	7,6 ± 0,5 ^a	7,8 ± 0,6 ^b

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla VI. Valores medios y DS de hemoglobina (g/dl), hematócrito (ml de eritrocitos/dl de sangre) y RBC (recuento eritrocitario en millones/mm³) a lo largo del experimento.

		CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
VCM	1° Mes	59,8 ± 1,5	58,4 ± 2,0	56,9 ± 1,9	57,4 ± 1,6
	2° Mes	57,4 ± 1,2	56,1 ± 1,6	56,5 ± 1,4	56,7 ± 1,9
	3° Mes	54,2 ± 1,1	54,4 ± 2,1	55,0 ± 1,9	56,0 ± 1,7
HCM	1° Mes	20,25 ± 0,4	20,1 ± 0,8	19,8 ± 0,6	20,0 ± 0,6
	2° Mes	19,4 ± 0,6	19,6 ± 0,9	19,8 ± 0,8	20,0 ± 0,5
	3° Mes	19,0 ± 0,4	19,0 ± 0,8	18,6 ± 0,9	19,5 ± 0,6
CHCM	1° Mes	33,95 ± 0,2	34,5 ± 0,4	34,7 ± 0,5	34,9 ± 0,4
	2° Mes	33,8 ± 1,1	34,9 ± 1,0	35,1 ± 1,1	35,4 ± 0,6
	3° Mes	34,9 ± 0,5	35,0 ± 0,8	33,9 ± 1,0	34,8 ± 0,5

VCM: Volumen Corpuscular Medio (μ 3).

HCM: Hemoglobina Corpuscular Media (pg).

CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (%).

Tabla VII. Valores medios \pm DS de los índices eritrocitarios al final del primer, segundo y tercer mes del estudio.

4.4.2. Recuento de leucocitos

En la tabla VIII se muestran los recuentos de leucocitos y linfocitos. Cabe destacar el aumento en el número de leucocitos en el grupo que realiza ejercicio, siendo significativos los valores alcanzados durante el primer y el tercer mes respecto al control. Los valores obtenidos son 10.395 ± 1.728 y 11.483 ± 1.724 del grupo entrenado frente a 8.575 ± 1.062 y 8.117 ± 1.303 del grupo control.

Los resultados obtenidos en relación al aumento de leucocitos están de acuerdo con la leucocitosis asociada al ejercicio físico. En general, el aumento de los niveles de catecolaminas da lugar a la leucocitosis (Barriga y cols., 1992).

La mayoría de los autores están de acuerdo en la existencia de una marcada granulocitosis durante la actividad física fundamentalmente cuando realizan ejercicio individuos sedentarios. Entre los posible mecanismos asociados se encuentra en primer lugar y sobre todo en ejercicio extenuante, la hemoconcentración producida. Por otro lado la adrenalina es capaz de movilizar los leucocitos marginales hacia la circulación y finalmente el cortisol, cuyos niveles pueden aumentar durante el ejercicio, moviliza los granulocitos desde la médula ósea hasta la circulación general.

Los niveles de leucocitos no varían por efecto del etanol como podemos apreciar en la tabla VIII. En relación al etanol, se ha descrito una leucopenia que hace más propensos a infecciones a los individuos alcoholizados y también se ha descrito granulocitopenia unida a cirrosis, resultado del acúmulo de granulocitos en el bazo agrandado de los pacientes. Cabe

destacar los trabajos de Liu (1973) en los que demuestra que esta leucopenia revierte con el cese de la ingestión alcohólica. En el mismo sentido se muestran otros trabajos realizados por Beard y Knott (1966).

	MES	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
Leucocitos	1°	8.575 ± 1.062	6.825 ± 826	10.395 ± 1.728 ^a	8.125 ± 1.728 ^c
	2°	8.383 ± 1.453	9.575 ± 2715	11.817 ± 2.570	11.360 ± 1.960
	3°	8.117 ± 1.303	8.300 ± 693	11.483 ± 1.724 ^a	9.667 ± 1.977
Linfocitos	1°	89,8 ± 3,2	90,2 ± 3,2	87,7 ± 3,0	91,8 ± 1,8
	2°	82,9 ± 5,6	87,4 ± 3,9	85,5 ± 4,1	80,7 ± 4,2
	3°	84,5 ± 1,9	89,0 ± 3,6	86,2 ± 3,9	87,9 ± 2,5

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla VIII. Valores medios y DS de los leucocitos (número de células/mm³) y linfocitos (%).

4.5. Fragilidad osmótica

Los parámetros que resumen el comportamiento eritrocitario en la lisis osmótica son X_{50} y σ . El valor X_{50} es la concentración de salino a la que se produce la lisis del 50% de la población siendo indicativo de la mayor o menor resistencia a la hemólisis hipotónica. σ es la amplitud de la distribución cuyo menor valor numérico indica una mayor distribución de las poblaciones que se pueden hemolizar. Los valores de ambos parámetros a lo largo del período experimental aparecen en la tabla IX.

La resistencia osmótica se incrementó significativamente (menor valor de X_{50}) en el grupo ejercitado al compararlo con el grupo control al final del primer mes del experimento. Las curvas de hemólisis correspondientes al final del primer mes se representan en la figura 4. El grupo ejercitado sufre un desplazamiento hacia la izquierda, es decir, un incremento en su resistencia a la lisis osmótica. Resultados similares han sido obtenidos por Bayon y cols., (1993). El otro cambio significativo lo muestra el grupo alcoholizado y entrenado, el cual muestra el efecto contrario, es decir el valor más alto de X_{50} ($86,5 \pm 1,8$ mM NaCl) lo que indica una mayor fragilidad osmótica para este grupo respecto a los demás.

La existencia de hemólisis intravascular durante el ejercicio ya ha sido comentada con anterioridad, el ejercicio favorece el recambio celular a través de la destrucción de células viejas y el aumento relativo de la concentración de células más jóvenes y resistentes, resultado similar al obtenido por Redondo y cols., (1995) en condiciones de anemia

experimental. Esta diferente conducta se muestra únicamente durante el primer mes de ejercicio ya que cuando se observan los datos correspondientes al segundo y tercer mes ya no existen dichas diferencias.

En cuanto al efecto del etanol, Hrelia y cols., (1986), han mostrado como el etanol aumenta la fluidez de las membranas plasmáticas en eritrocitos humanos. La administración crónica de etanol altera también la composición lipídica y el ensamblaje glicoproteico de las membranas celulares (Lieber, 1992).

La mayor presencia de células eritrocitarias jóvenes puede variar las curvas de distribución. La figura 5, muestra las curvas de distribución de todos los grupos experimentales durante el primer mes. La figura 6 muestra las curvas correspondientes a primer, segundo y tercer mes del grupo que realiza ejercicio, el cual presenta poblaciones eritrocitarias más dispersas, lo que está reflejado por un descenso en los valores de β , que pueden corresponder a células eritrocitarias en distintos estadios de maduración.

En cambio en el grupo que bebe alcohol y realiza ejercicio, las poblaciones eritrocitarias que se manifiestan en la curva disminuyen, lo que se refleja por un mayor valor de β . Ello podría indicar una menor respuesta eritropoyética aunque los valores de hematócrito sean similares para ambos grupos (figura 7).

		CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
X_{50}	1° Mes	81,4 ± 2,8	81,9 ± 1,1	74,9 ± 5,2 ^a	86,5 ± 1,8 ^{bc}
	2° Mes	80,0 ± 1,8	79,6 ± 4,7	81,9 ± 3,0	81,4 ± 0,4
	3° Mes	78,5 ± 2,3	75,3 ± 4,4	77,8 ± 3,5	80,4 ± 2,3
β	1° Mes	243 ± 58,0	241 ± 26,6	272 ± 69,60	177 ± 77,7
	2° Mes	258 ± 88,9	253 ± 34,6	188 ± 32,0	214 ± 23,0
	3° Mes	285 ± 20,0	214 ± 35,6 ^a	185 ± 42,1 ^a	204 ± 44,4

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

X_{50} : fragilidad osmótica media (mM NaCl).

β : dispersión de la curva de distribución.

Tabla IX. Parámetros relacionados con la hemólisis hipotónica.

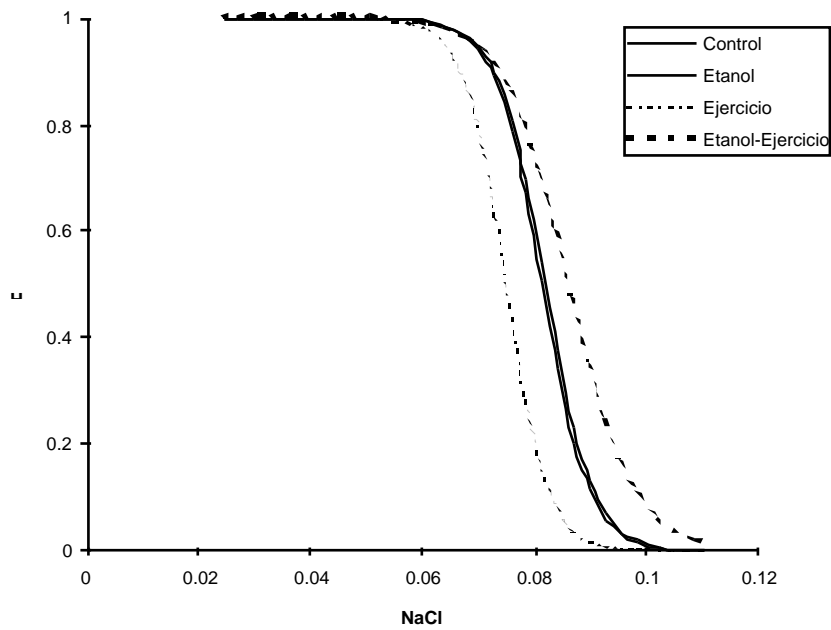


Figura 4. Representación del porcentaje de hemólisis (H) frente a la concentración mM de NaCl, al final del primer mes del estudio.

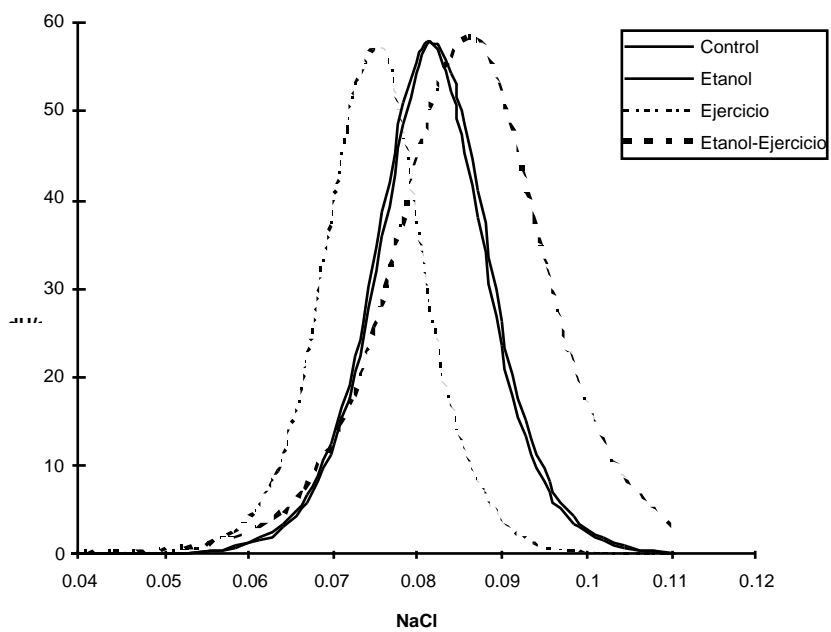


Figura 5. Distribución eritrocitaria a partir de la fragilidad osmótica. Representación de la variación en el porcentaje de hemólisis (H) con respecto a la concentración de NaCl (mM) (X) en función de la concentración NaCl (mM) al final del primer mes de tratamiento.

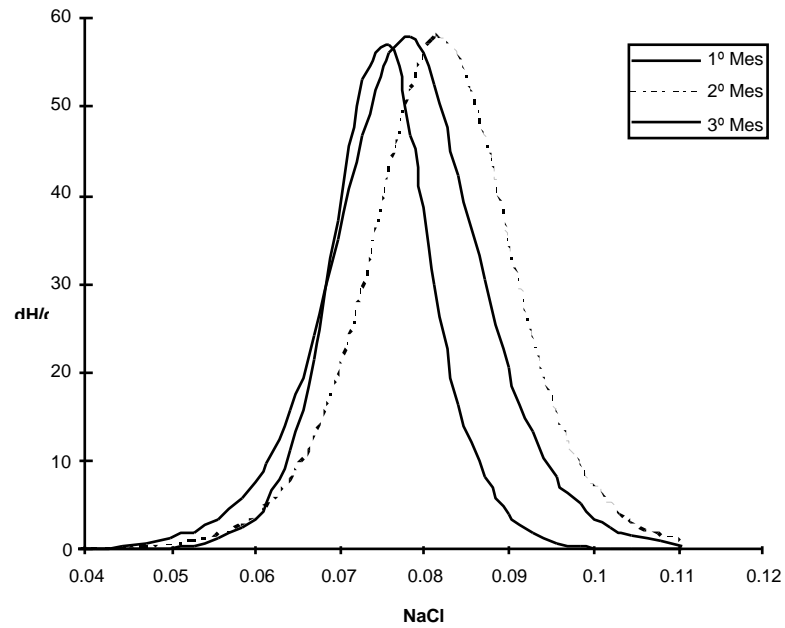


Figura 6. Distribución eritrocitaria a partir de la fragilidad osmótica. Representación de la variación en el porcentaje de hemólisis (H) con respecto a la concentración de NaCl (mM) (X) en función de la concentración NaCl (mM) durante los tres meses de tratamiento del grupo entrenado.

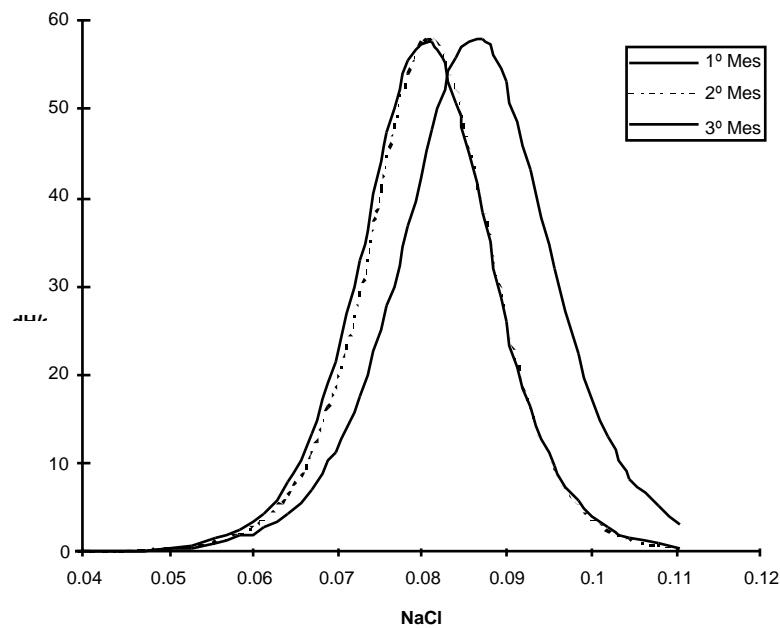


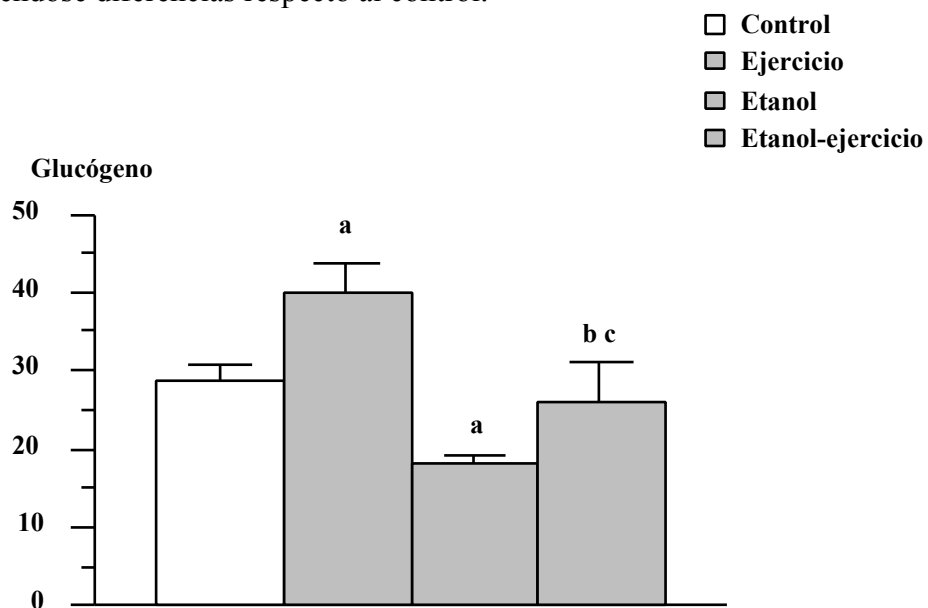
Figura 7. Distribución eritrocitaria a partir de la fragilidad osmótica. Representación de la variación en el porcentaje de hemólisis (H) con respecto a la concentración de NaCl (mM) (X) en función de la concentración NaCl (mM) durante los tres meses de tratamiento del grupo que realiza ejercicio y recibe etanol.

4.6. Glucógeno hepático

Los niveles hepáticos de glucógeno, aumentan de forma significativa con el ejercicio, como podemos ver en la figura 8 ($40,2 \pm 3,7$ vs $28,5 \pm 2$ mg/g de hígado). En los últimos años han aumentado los trabajos que demuestran que el entrenamiento incrementa la capacidad gluconeogénica hepática. Los animales entrenados muestran una elevada resistencia a la hipoglucemia. Así el ejercicio eleva los niveles de glucosa y aumenta la concentración de lactato y alanina, ambos sustratos gluconeogénicos (Dohm y Newsholme., 1983; Sumida y Donovan, 1995).

El alcohol disminuye los niveles de glucógeno hepático; $18,2 \pm 1,1$ vs $28,5 \pm 2$ (mg/g de hígado). Dos factores se hallan implicados en este descenso: la inducción de la fosforilasa hepática que produce un rápido descenso en dichos niveles y el aumento de la relación NADH/NAD como consecuencia del metabolismo del etanol (Gordon y Lieber, 1992).

En el grupo que realiza ejercicio y ingiere alcohol los niveles de glucógeno se mantienen, no obteniéndose diferencias respecto al control.



a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al control del grupo ejercitado y del grupo alcoholizado.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al etanol del grupo entrenado-alcoholizado.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al ejercicio del grupo entrenado alcoholizado.

Figura 8. Niveles medios y DS de glucógeno hepático (mg/g de hígado), en los grupos estudiados, al final del experimento.

4.7. Metabolismo energético en el músculo esquelético

El estudio del metabolismo esquelético se abordó mediante la valoración de diversas actividades enzimáticas así como por el estudio de la capilaridad muscular. Los resultados se

expresan en Unidades, (U) correspondiendo 1 U a un micromol de sustrato transformado por minuto y por gramo de músculo.

4.7.1. Perfil enzimático

De las distintas actividades enzimáticas presentes en el músculo se eligieron como indicadores del metabolismo muscular: citrato sintasa (CS), 3-hidroxiacil-coenzima A-deshidrogenasa (HAD), la actividad hexoquinasa (HK), piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) (tablas X, XI, XII, XIII y XIV).

Las enzimas CS y HAD se localizan en las mitocondrias siendo por tanto marcadoras del perfil oxidativo; en concreto intervienen en el ciclo de Krebs y en la β -oxidación de los ácidos grasos respectivamente. La actividad HK es responsable de la fosforilación de la glucosa cuando ésta entra en la célula muscular. La glucosa-6-fosfato formada puede seguir dos vías en el músculo esquelético, incorporarse a glucógeno o degradarse por la vía glucolítica. La HK es una enzima cuya actividad por tanto, depende de los niveles de glucosa y varía en los distintos músculos siendo más alta en el corazón que en el músculo esquelético. PK y LDH son enzimas citosólicas relacionadas con el metabolismo glucolítico.

Antes de comparar los resultados obtenidos por efecto de los distintos tratamientos es necesario comentar las actividades específicas de las enzimas en los músculos estudiados: sóleo, plantaris, gastrocnemio rojo y gastrocnemio blanco, para establecer las características metabólicas de estos músculos en la rata.

Así, las enzimas glucolíticas PK y LDH muestran los valores más elevados en músculos con mayoría de fibras tipo IIB, como son el gastrocnemio blanco y el plantaris (figura 9a y b), la HAD es más alta en los músculos con mayoría de fibras tipo I como el sóleo y el gastrocnemio rojo (figura 9d).

Si consideramos la actividad CS como marcador del metabolismo oxidativo podemos decir que el mayor potencial oxidativo (mayor actividad) lo muestra el gastrocnemio rojo seguido del plantaris (ambos músculos, gastrocnemio rojo y plantaris tienen el mayor porcentaje de fibras IIA) y del sóleo, correspondiendo al gastrocnemio blanco la menor actividad (figura 9c).

Estos resultados están de acuerdo con descritos por (Armstrong, 1988) que indican que en la rata el tipo de fibra IIA es el de mayor capacidad oxidativa. En cuanto al potencial glucolítico es el gastrocnemio blanco (con mayoría de fibras tipo IIB) el músculo con mayores actividades PK y LDH, presentando el sóleo los valores más bajos.

La capacidad oxidativa de los músculos estudiados en orden decreciente sería: gastrocnemio rojo>plantaris>sóleo>gastrocnemio blanco y siguiendo el mismo criterio la capacidad glucolítica: gastrocnemio blanco>plantaris> gastrocnemio rojo>sóleo (figura 9).

4.7.1.1. Actividades enzimáticas musculares: efecto del ejercicio

El metabolismo muscular experimenta importantes variaciones como respuesta al ejercicio, para aumentar la capacidad oxidativa y retrasar la aparición de la fatiga muscular. Son numerosos los estudios que muestran un aumento de la capacidad oxidativa muscular como respuesta al entrenamiento de resistencia (ver apartado correspondiente en la revisión bibliográfica). Este aumento se refleja en las actividades de enzimas oxidativas mitocondriales, tales como citrato sintasa, citocromo c oxidasa, succinato deshidrogenasa etc. que varían en distinto grado según la intensidad y duración del ejercicio. También se han descrito aumentos en condiciones de ejercicio físico para la actividad HAD, dichos incrementos reflejan una mayor concentración arterial de ácidos grasos libres y por tanto, una dependencia de la oxidación de ácidos grasos durante el ejercicio. Green y cols., (1983) muestran aumentos significativos en músculos de rata de las actividades CS y HAD con el entrenamiento resistencia en rata. Así en el vasto lateral rojo o profundo la actividad CS aumenta un 52% y HAD un 16% y en el vasto lateral blanco o superficial los aumentos son de un 54% y un 12% respectivamente.

En nuestros resultados el único incremento para la actividad CS por efecto del ejercicio lo presenta el sóleo que de $21,5 \pm 1,9 \mu\text{mol/ min g}$ pasa a $26,3 \pm 1,1 \mu\text{mol/ min g}$ (tabla X). En el resto de los músculos no aparecen aumentos, incluso existen músculos con menor actividad como es el caso del plantaris, que presenta un descenso significativo por efecto del ejercicio (desde $27,5 \pm 1,8$ a $21,8 \pm 2,9 \mu\text{mol/ min g}$) no existiendo diferencias significativas en el resto. Es llamativo este descenso dado que el plantaris presenta el mayor porcentaje de fibras IIA, de entre los estudiados, y como hemos visto anteriormente una gran capacidad oxidativa. Sin embargo, el grupo entrenado tiene un menor porcentaje de fibras IIA y un incremento de las IIB, (tabla XVII), que aunque no es significativo podría influir en la menor actividad enzimática de la CS.

En cuanto a la actividad HAD el único cambio lo muestra el gastrocnemio blanco, en el cual disminuye de forma significativa con el entrenamiento (tabla XI).

En cuanto a las enzimas glucolíticas los datos bibliográficos muestran distintas variaciones según la composición fibrilar del músculo en estudio. El ejercicio que produce un aumento en el contenido mitocondrial del músculo esquelético, también produce un aumento en la actividad HK (Barnard y Peter, 1969; Baldwin y cols., 1973). Así resultados procedentes de biopsias musculares en deportistas indican que la HK aumenta su actividad en un 150%

músculos con mayoría de fibras tipo I mientras que en músculos con mayor porcentaje de fibras IIA o IIB sólo aumenta un 30 o 50% respectivamente (Fox, 1984).

En ratas sometidas a un ejercicio intenso la actividad HK se incremento un 170% en músculos rápidos rojos , un 52% en lentos rojos y un 30% en blancos (Holloszy y Coyle.,1984). Nuestros resultados indican incrementos mas modestos debido a la menor intensidad del ejercicio así existe un aumento de un 18% para el gastrocnemio rojo, 16% para el sóleo y de un 13% para el gastrocnemio blanco. En el plantaris no se modifica la actividad HK, aunque en valores absolutos es el músculo que mayores actividades presenta (figura 10). En general, las enzimas glucolíticas sufren pequeños cambios en respuesta a ejercicio de resistencia.

Acerca del resto de enzimas glucolíticas, se ha descrito que en ejercicios de resistencia en músculos rojos rápidos de rata, que poseen alta capacidad glucolítica, se produce un descenso de varias actividades. Así disminuyen del orden de un 20% las actividades glucógeno fosforilasa, PFK, PK, Glucosa 3-fosfato deshidrogenasa y LDH (Baldwin y cols., 1973; Green y cols., 1983). Estos mismos autores sugieren que el ejercicio produce una transformación de las fibras rápidas hacia un perfil mas oxidativo al disminuir las actividades glucolíticas.

En contraposición, en el músculo lento oxidativo se producen pequeños incrementos de algunas de estas actividades con el entrenamiento de resistencia (Abernethy y cols 1990).

En nuestros resultados la tendencia es disminuir la capacidad glucolítica con el ejercicio. Así podemos ver una disminución significativa en la actividad enzimática de LDH (tabla XIII) que es de un 20% en gastrocnemio rojo, 22% en plantaris y 19% en sóleo, mientras que en el gastrocnemio blanco dicha actividad no varía. En cuanto a la PK (tabla XIV) el descenso es de menor importancia, 7% en gastrocnemio rojo, 10% en plantaris y en el gastrocnemio blanco disminuye en un 20%.

Por último y de acuerdo con los incrementos de las actividades glucolíticas en los músculos oxidativos por efecto del ejercicio, en el sóleo la actividad PK se induce significativamente duplicándose por efecto del ejercicio (tabla XIV).

4.7.1.2. Actividades enzimáticas musculares: efecto del etanol

En cuanto a las variaciones metabólicas inducidas por la administración crónica de etanol, cabe destacar el efecto lesivo del alcohol sobre el músculo causando la miopatía alcohólica crónica. Como hemos visto esta miopatía afecta de forma preferente las fibras de tipo IIB. Varios autores han tratado de relacionar esta atrofia selectiva con alteraciones del metabolismo glucolítico. Cook y cols., (1992), señalan al respecto que los músculos extensor

lateral de los dedos (EDL) y sóleo de ratas a las que se les suministra etanol de forma crónica sufren graves alteraciones en el metabolismo de la glucosa sobre todo en relación a la tasa de formación de glucógeno y alanina. Spolarics y cols., (1994) señalan que la administración aguda de etanol inhibe un 50% la captación de glucosa en músculos esqueléticos de rata, en concreto en sóleo, gastrocnemio y cuádriceps rojo, inhibición que se manifiesta incluso en animales hiperinsulinémicos en los que se ha duplicado la cantidad de glucosa basal. Actividades de enzimas como LDH, HK y PK, se ven disminuidas en el músculo vasto lateral de ratas relación al consumo crónico de alcohol (Trounce y cols., 1990).

Nuestros resultados muestran alteraciones de las enzimas glucolíticas pero éstas tienden más bien a incrementarse en los músculos estudiados. La PK (tabla XIV) muestra incrementos significativos en gastrocnemio blanco (22%) y en sóleo (26%). Del estudio de la influencia del alcohol en el metabolismo glucolítico lo más llamativo es el incremento de la actividad HK (tabla XII) en el gastrocnemio blanco que pasa de $1,67 \pm 0,15 \mu\text{mol}/\text{min}$ a $2,16 \pm 0,07 \mu\text{mol}/\text{g min}$, no mostrando variaciones significativas en el resto. Es significativo que el músculo con mayor capacidad glucolítica, sea el más afectado, lo que indicaría un efecto selectivo del etanol sobre músculos con predominancia de fibras de contracción rápida (tipo IIB).

En cuanto a la actividad HAD, los resultados reflejan una tendencia a la disminución por efecto del etanol, siendo de mayor grado en el gastrocnemio blanco mayor grado (17%) aunque no de forma significativa (tabla XI). La CS únicamente muestra aumentos que son significativos en el caso del músculo plantaris (25%) (tabla X).

En resumen, podemos decir que el etanol, altera el metabolismo glucolítico en músculos con un mayor porcentaje en fibras de tipo IIB, mientras que el metabolismo oxidativo se ve mayoritariamente afectado en los músculos mixtos como el plantaris.

4.7.1.3. Actividades enzimáticas musculares: efecto del ejercicio y etanol

En personas que ingieren alcohol y realizan ejercicio se ha demostrado que el etanol puede inhibir de forma aguda la captación de glucosa por el músculo, y reducir el efecto estimulante del ejercicio prolongado en los músculos de las extremidades. Juhlin-Dannfelt y cols., (1978); Shelmet y cols (1988), han indicado tras la ingesta de alcohol la existencia de una resistencia periférica aguda a la insulina, que disminuiría la oxidación de glucosa. Sin embargo, estas variaciones ocurren en breve plazo, atenuándose y desapareciendo estos efectos en tratamientos más duraderos (Cook y cols., 1992).

Nuestros resultados con respecto a las actividades enzimáticas musculares del grupo sometido a entrenamiento y con tratamiento de etanol dependen del tipo de músculos, así en músculos glucolíticos como el gastrocnemio blanco y el plantaris existe una tendencia a la

mayor utilización de grasas (incremento de la actividad HAD y CS) en detrimento de las actividades eminentemente glucolíticas como la PK. Por otra parte el resto de las enzimas glucolíticas, se ven afectadas en distinto grado, así la LDH disminuyen en el gastrocnemio rojo y plantaris, si bien este efecto es mayoritariamente consecuencia del ejercicio.

En los músculos oxidativos, la actividad HK relacionada con la utilización de glucosa exógena, es la que se induce en esta situación. Así la actividad HK en sóleo aumenta significativamente en este grupo con respecto al etanol y con respecto al ejercicio y lo mismo ocurre con el gastrocnemio rojo (tabla XI).

Son paradójicos nuestros resultados ya que la tendencia descrita es que el etanol deprime la captación de glucosa en el músculo. A este respecto, se ha demostrado que en ejercicio se aumenta la captación de glucosa como resultado de incrementos en la concentración de transportadores GLUT-4 en el músculo (Hargreaves, 1995; Gulve y Spina, 1995), este efecto está mediado por hormonas y por la propia contracción muscular (Yeh y cols., 1995). El aumento de los niveles de calcio durante la contracción muscular, está implicado en la activación del transporte de glucosa (Youn y cols., 1991). Un reciente trabajo de Hatori y cols., (1995) demuestra que existe una concentración óptima de etanol, en presencia de concentraciones iónicas elevadas en músculo, que potencia el mecanismo de contracción.

Si el mecanismo de contracción, en determinadas circunstancias, se potencia por el etanol, sería una posible explicación para el aumento de la captación de glucosa asociado a la ingesta de alcohol y la realización de ejercicio.

En el sóleo, gastrocnemio rojo y gastrocnemio blanco en los que se induce la hexoquinasa por efecto del ejercicio, dicha actividad aumenta aún mas en estos músculos por efecto del alcohol, no ocurriendo esto en plantaris.

En resumen no se puede explicar un efecto concreto de los tratamientos en el músculo, es decir, cuando se observa el efecto tanto del ejercicio, como de la administración de alcohol como la acción conjunta de ambos hay que considerar las características metabólicas del músculo, o de la zona del músculo estudiada. Las características metabólicas medidas por las actividades enzimáticas oxidativas y glucolíticas así mismo dependen de su composición miofibrilar y en última instancia de la función del músculo en cuestión.

En este estudio en la realización del ejercicio no han participado de la misma forma sóleo, plantaris, gastrocnemio rojo y blanco, existiendo además el efecto de la variación interindividual. No obstante, los resultados obtenidos con respecto al ejercicio están de acuerdo con la bibliografía.

El efecto del etanol en nuestras condiciones experimentales no reproduce el hallado en la bibliografía que describe un menor metabolismo glucolítico en músculos con alto porcentaje de fibras de tipo IIB. El grado de alcoholización en estos animales es menor y la respuesta en este caso no es la misma.

Por último cuando se unen alcohol y ejercicio, el alcohol puede potenciar el efecto del ejercicio en el músculo.

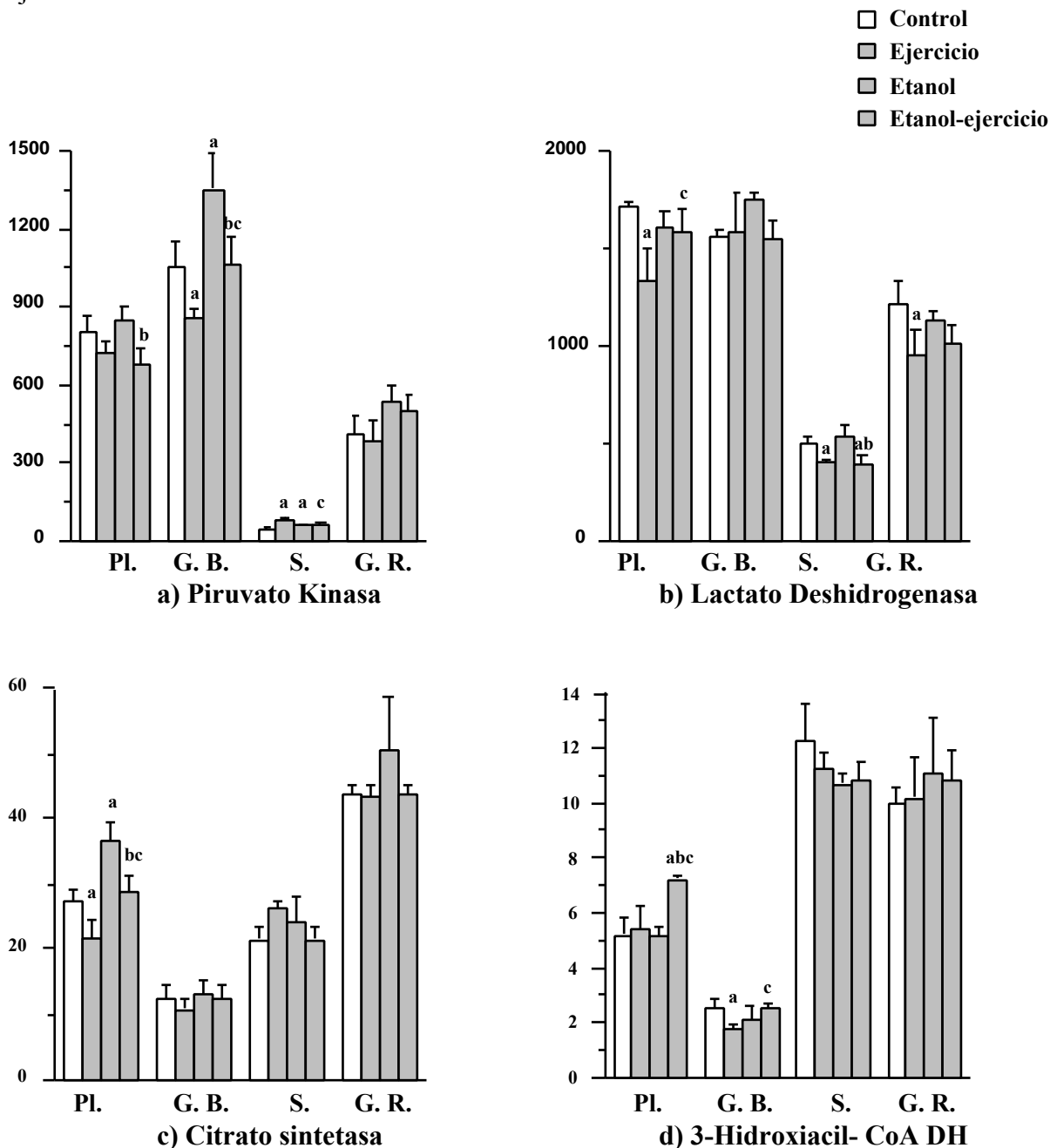


Figura 9. Valores medios y DS de las actividades enzimáticas musculares ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{gramo}$ de peso) de la piruvato quinasa (a), lactato deshidrogenasa (b), citrato sintetasa (c) y 3-Hidroxiacil-CoenzimaA-deshidrogenasa (d) en plantaris (Pl.), gastrocnemio blanco (G. B.), sóleo (S.) y gastrocnemio rojo (G.R.).

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
G. Rojo	43,9 ± 1,4	50,5 ± 8,1	43,3 ± 2,1	38,4 ± 2,9
Sóleo	21,5 ± 1,9	24,2 ± 4,0	26,3 ± 1,1	24,9 ± 3,3
Plantaris	27,5 ± 1,8	36,7 ± 2,7 ^a	21,8 ± 2,9 ^a	29,0 ± 2,2 ^{bc}
G. Blanco	12,6 ± 2,0	13,2 ± 2,2	10,8 ± 1,4	11,5 ± 0,3

a Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla X. Actividad de la Citrato sintasa ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{gramo de peso}$) \pm DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
G. Rojo	10,0 ± 0,6	11,1 ± 2,0	10,2 ± 1,5	10,8 ± 1,1
Sóleo	12,3 ± 1,31	10,7 ± 0,37	11,26 ± 0,56	10,8 ± 0,66
Plantaris	5,20 ± 0,65	5,15 ± 0,31	5,42 ± 0,85	7,22 ± 0,09 ^{bc}
G. Blanco	2,50 ± 0,38	2,11 ± 0,51	1,80 ± 0,11 ^a	2,52 ± 0,22 ^c

a Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XI. Actividad de la -Hidroxiacil-CoenzimaA-Deshidrogenasa (HAD) ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{gramo de peso}$) \pm DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.

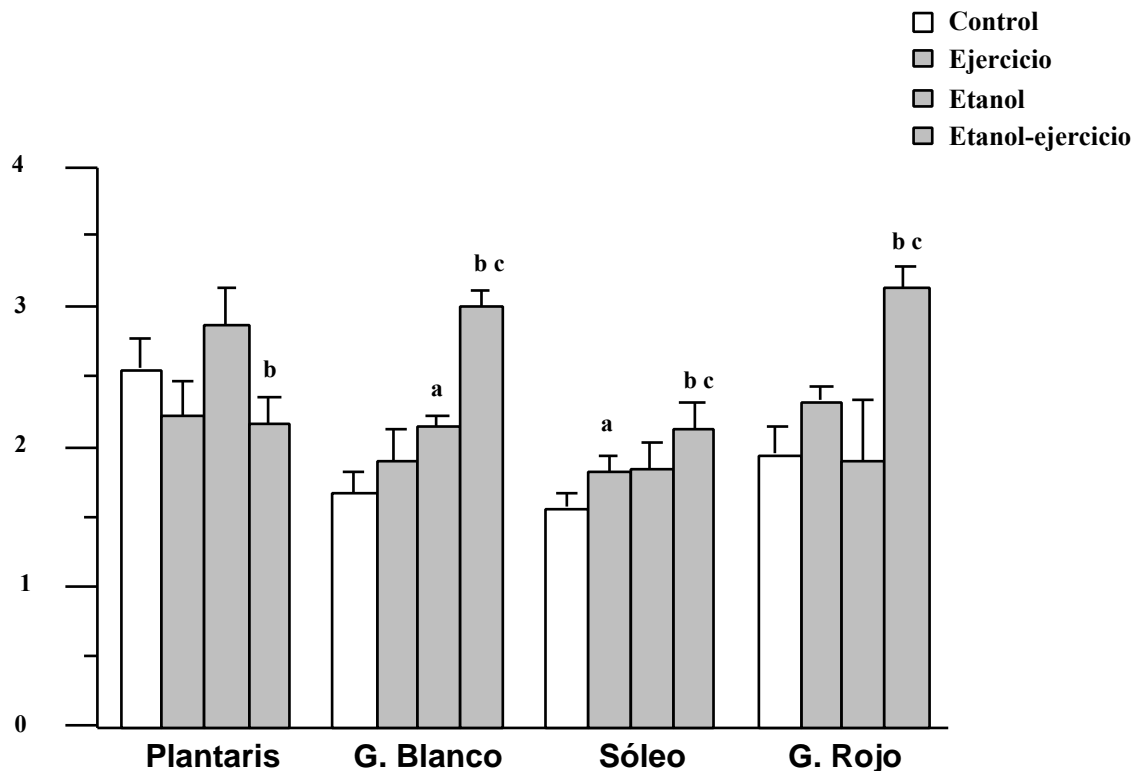
	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
G. Rojo	1,96 ± 0,19	1,91 ± 0,43	2,33 ± 0,12	3,15 ± 0,15 ^{bc}
Sóleo	1,57 ± 0,10	1,84 ± 0,19	1,83 ± 0,12 ^a	2,14 ± 0,19 ^{bc}
Plantaris	2,55 ± 0,22	2,89 ± 0,27	2,23 ± 0,24	2,17 ± 0,18 ^b
G. Blanco	1,67 ± 0,15	2,16 ± 0,07 ^a	1,89 ± 0,25	3,00 ± 0,13 ^{bc}

a Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XII. Actividad de la Hexoquinasa (HK) ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{gramo de peso}$) \pm DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.



a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Figura 10. Actividad enzimática de la Hexoquinasa en los distintos músculos y porciones musculares estudiadas.

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
G. Rojo	1.206 ± 116	1.118 ± 48	956 ± 123^a	1.018 ± 85
Sóleo	499 ± 31	534 ± 58	403 ± 9^a	393 ± 47^b
Plantaris	1.707 ± 24	1.602 ± 79	1.328 ± 163^a	1.584 ± 108^c
G. Blanco	1.553 ± 33	1.750 ± 37	1.574 ± 204	1.540 ± 102

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XIII. Actividad de la Lactato deshidrogenasa (LDH) ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{gramo de peso}$) \pm DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
G. Rojo	415 ± 69	537 ± 65	388 ± 82	502 ± 58
Sóleo	45,6 ± 9,2	61,4 ± 1,7 ^a	83,4 ± 7,5 ^a	63,1 ± 11,7 ^c
Plantaris	802 ± 59	846 ± 49	725 ± 49	683 ± 59 ^b
G. Blanco	1.052 ± 94	1.351 ± 135 ^a	849 ± 36 ^a	1.056 ± 112 ^{bc}

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XIV. Actividad de la Piruvato quinasa (PK) ($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{gramo de peso}$) \pm DS, en los diferentes músculos estudiados al final del experimento.

4.7.2. Estudio de capilaridad

La capilaridad se estudia a través de la variación de la densidad capilar (Capilares/ mm^2) y del número de capilares por fibra (C/F) mediante el conteo directo de los capilares en preparaciones musculares teñidas con la técnica ATPasa a pH 4,0. Tanto el número de capilares como su densidad, son importantes marcadores del aporte de oxígeno a las células musculares.

Esta generalmente asumido que la capilaridad se relaciona con la capacidad oxidativa del músculo. Así las fibras lentas que poseen un alto potencial oxidativo están rodeadas por un mayor número de capilares que las fibras que dependen mayoritariamente de su capacidad anaeróbica (Romanul, 1965; Ingjer, 1979) (LÁMINA 2).

Maxwell y cols., (1980), estudiaron la relación entre la capacidad oxidativa del músculo medida a través de la actividad succinato-deshidrogenasa y la capilaridad en distintos animales, no encontrando una correlación significativa. Posteriormente Tesch y Karlsson, (1985), de acuerdo con estudios anteriores (Sjödín, 1976) hallaron una correlación entre la distribución capilar y la actividad de la citrato sintasa. Nuestros resultados (tabla XV) muestran también dicha correlación., ya que el orden decreciente de capilaridad coincide con el de la actividad citrato sintasa (tabla X y figura 9c), siendo el gastrocnemio rojo el músculo con los mayores valores , seguido del plantaris, sóleo y gastrocnemio blanco.

Nuestros resultados concuerdan con los hallados en la bibliografía, en los cuales la mayor densidad capilar corresponde al gastrocnemio rojo con $2,08 \pm 0,15$ capilares/fibra, esta parte del músculo tiene el mayor porcentaje de fibras I y IIA (tabla XVI). La menor distribución capilar la presenta el gastrocnemio blanco con $1,26 \pm 0,10$ capilares/fibra siendo una porción muscular que carece de estos tipos de fibras.

El entrenamiento aumenta la distribución capilar en los músculos ejercitados (Andersen, 1975; Ingjer, 1979; Klausen y cols., 1981). El significado del desarrollo capilar es permitir a la sangre un tiempo de tránsito suficiente y una mayor superficie de distribución para aumentar la eficiencia en el intercambio de gases respiratorios, sustratos y metabolitos (Saltin y cols., 1986). El entrenamiento de resistencia incrementa el número de capilares por fibra en todos los músculos estudiados de forma significativa frente al grupo control.

La magnitud en porcentaje de los incrementos es la siguiente: sóleo, un 34% plantaris y gastrocnemio blanco un 22% y el gastrocnemio rojo un 14%. Cuando se estudia el incremento de la densidad capilar los aumentos unicamente son significativos para el sóleo y el plantaris. El sóleo es el único músculo en el que aumenta, aunque no de forma significativa, la actividad citrato sintasa por efecto del ejercicio por lo que se puede pensar que esta correlación capilaridad-citrato sintetasa se mantiene en músculos oxidativos con el ejercicio.

Aunque son escasos los estudios acerca del efecto del etanol en la capilaridad del músculo esquelético, se ha establecido que la ingestión aguda de alcohol produce un efecto vasodilatador en tejidos periféricos (Friedman y cols., 1982). Altura y cols., (1990) en músculos de ratas (cremaster) observan un efecto vasoconstrictor del etanol en arteriolas y venulas, mientras que el efecto de sus metabolitos, acetaldehido y acetato fué el inverso. Por lo tanto el etanol produce una disminución del lumen de los vasos sanguíneos, y este efecto no es mediado por los metabolitos resultantes de su oxidación. Su acción a lo largo del tiempo puede estar relacionada con el desarrollo de la miopatía alcohólica.

En nuestros resultados, es en esta parte del estudio donde se observa como el alcohol afecta de forma preferente a los músculos con mayor porcentaje en fibras de tipo IIB, ya que existe una reducción significativa en el gastrocnemio blanco tanto del número de capilares por fibra (C/F) que pasa de $1,26 \pm 0,1$ a $0,97 \pm 0,06$ como de la densidad capilar, que pasa de 245 ± 25 a 212 ± 26 capilares por mm^2 . En el resto de los músculos no hay cambios por la administración de etanol. Altura y cols., (1990) han obtenido similares resultados, relacionando el menor aporte capilar con la miopatía alcohólica. El plantaris no se ve afectado en la misma medida que el gastrocnemio blanco. Esto indica que el etanol no afecta por igual a los músculos.

Los efectos sobre la capilaridad por acción de ambos tratamientos alcohol y ejercicio muestran que en cierta medida el ejercicio revierte el efecto del alcohol en los músculos con mayor porcentaje de fibras de tipo IIB, así en el gastrocnemio blanco aumenta el número de capilares por fibra y la densidad capilar con respecto al grupo que recibe alcohol. En los músculos gastrocnemio rojo y sóleo, el efecto que predomina es el del ejercicio y en ambos aumenta la distribución capilar, sin observarse ningún efecto asociado a la ingesta de alcohol. En el plantaris que también se ve afectado por el alcohol pero en menor medida, el efecto del ejercicio sobre el aumento de la red capilar es menos notorio que en el gastrocnemio blanco.

El efecto del etanol se ve atenuado por el ejercicio, esto estaría de acuerdo con un incremento en la eliminación del etanol en sangre relacionado con el ejercicio (Ardies y cols., 1989).

En resumen en cuanto a la distribución capilar, debemos señalar que el etanol afecta de forma prioritaria a los músculos o zonas de músculos con mayor presencia de fibras tipo II, (plantaris y gastrocnemio blanco), predominando el efecto del ejercicio en los que poseen mayoría de fibras tipo I (sóleo y gastrocnemio rojo).

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
C/F				
Plantaris	1,72 ± 0,17	1,58 ± 0,12	1,95 ± 0,07 ^a	1,59 ± 0,08
Sóleo	1,67 ± 0,16	1,97 ± 0,23	2,24 ± 0,17 ^a	2,21 ± 0,26
G. Rojo	2,08 ± 0,15	1,92 ± 0,12	2,38 ± 0,11 ^a	2,40 ± 0,13 ^b
G. Blanco	1,26 ± 0,10	0,97 ± 0,06 ^a	1,45 ± 0,14 ^a	1,10 ± 0,08 ^{bc}
C/mm²				
Plantaris	477 ± 35	504 ± 19	575 ± 46 ^a	536 ± 22
Sóleo	380 ± 21	431 ± 34	553 ± 30 ^a	583 ± 47 ^b
G. Rojo	650 ± 68	581 ± 30	673 ± 70	727 ± 59 ^b
G. Blanco	245 ± 25	212 ± 26	273 ± 21	219 ± 21 ^c

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XV. Valor medio y DS del número de capilares por fibra (C/F) y de la densidad capilar (C/mm²) en los distintos músculos y tratamientos.

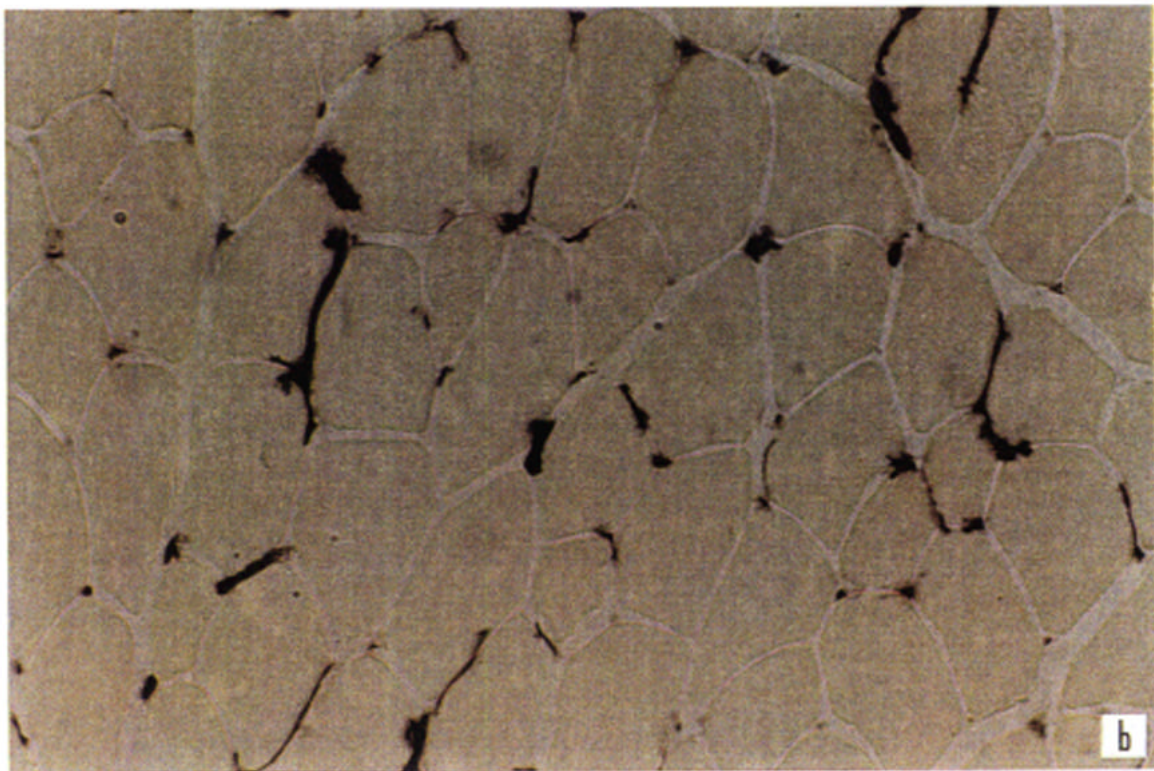
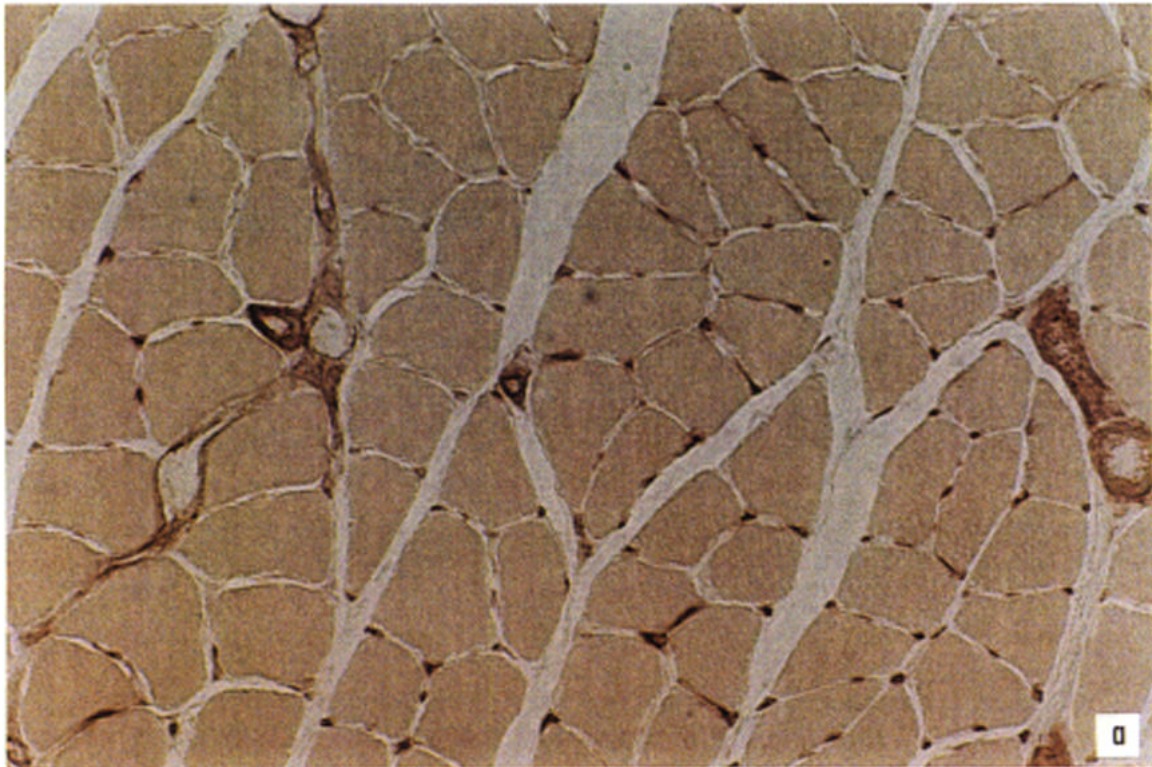


LÁMINA 2. Fotografías correspondientes al sóleo (**a**) y gastrocnemio blanco (**b**), en las que se visualizan los capilares mediante la técnica ATPasa, pH 4,0.

4.8. Composición miotipológica

Dentro de este apartado se comentará la distribución en porcentaje de los tipos fibrilares en los músculos estudiados, así como la existencia de modificaciones en este parámetro como consecuencia de los distintos tratamientos. Como se ha comentado en el apartado correspondiente de la revisión bibliográfica el ejercicio induce adaptaciones neuromusculares a distintos niveles en las vías motoras. Actualmente se admite que los cambios que ocurren en las fibras como consecuencia de los tipos de entrenamiento son debidos al estiramiento de las mismas. La respuesta está mediada por segundos mensajeros que inducen la expresión de genes “musculares”, o tiene lugar por adaptaciones celulares a nivel del RNAm. Fenómenos de hipertrofia, hiperplasia y cambios de fibras lentas a rápidas o viceversa han sido descritos generalmente como adaptaciones al ejercicio físico. Los mecanismos que provocan estas adaptaciones no se conocen con exactitud y en la actualidad no existen conclusiones definitivas (Häkkinen, 1994; Maccomas, 1994).

Costerbosa y cols., (1987), señalan la posibilidad de que el aumento de fibras de tipo I tras el entrenamiento sea debido a la formación de nuevas fibras por el fenómeno de escisión fibrilar o *splitting* a partir de células satélite. A este respecto, Antonio y Gonyea, (1993) demuestran la existencia de fenómenos de hiperplasia en las tres formas de aumento de la masa muscular: hipertrofia compensadora, estiramiento y ejercicio. La causa determinante se debe a la expresión de isomiosinas embrionarias que formarían nuevas fibras, aunque también estarían implicadas las células satélite.

Howald y cols., (1985), en atletas realizando entrenamientos de resistencia obtuvieron diferencias significativas comparando los porcentajes de fibras proponiendo la existencia de una conversión fibrilar en el siguiente sentido: tipo IIB tipo IIA tipo I, al aumentar este último tipo su porcentaje de forma significativa frente a un descenso de las fibras IIB, permaneciendo sin cambios las IIA. Por otra parte un reciente trabajo de Bassett, (1994) descarta el cambio en la relación fibrilar tipoI/tipoII asociado al entrenamiento aeróbico. Las diferencias en los resultados pueden deberse tanto a las técnicas empleadas para la identificación fibrilar como al entrenamiento realizado.

Los resultados del porcentaje fibrilar se muestran en las tablas XVI (gastrocnemio rojo y mixto) y XVII (plantaris y sóleo) (LÁMINA 4 y LÁMINA 3). Los resultados correspondientes al gastrocnemio blanco no se muestran dada la uniformidad en la composición miofibrilar (100% de fibras tipo IIB) sin variación en los distintos tratamientos. El entrenamiento no varía de forma significativa el porcentaje de los distintos tipos de fibras en los músculos estudiados.

Debemos llamar la atención sobre los resultados obtenidos en el músculo gastrocnemio, tanto en la porción roja como en la mixta, ya que presenta la tendencia descrita

por Howald y cols., (1985), con una disminución en el porcentaje de fibras IIB y un aumento de las fibras de tipo I, sin ser las diferencias estadísticamente significativas. En el plantaris ocurre lo contrario y aparece un mayor porcentaje de fibras tipo IIB en el grupo entrenado respecto al control ($53,0 \pm 4,9$ vs $56,6 \pm 4,3$) con un descenso en las de tipo IIA ($33,2 \pm 4,9$ vs $29,4 \pm 4,8$). Esta variación no es significativa, pudiendo deberse a la variedad interindividual.

Así como numerosos investigadores han estudiado la composición fibrilar en relación al entrenamiento, muy pocos han estudiado este parámetro en relación al consumo de etanol. Gonzalez-Hernández y cols., (1989) en ratones tratados con etanol al 19% en agua de bebida durante 40 días a partir del momento del nacimiento, hallaron cambios significativos en las tres áreas del gastrocnemio. Señalan que produce un incremento en el porcentaje de las fibras IIA en detrimento de las IIB, mientras que las fibras tipo I no experimentan variaciones. Este descenso está en relación con la pérdida de la capacidad glucolítica. Similares resultados fueron obtenidos por Trounce y cols., (1990) en ratas alcoholizadas con etanol en agua de bebida al 25%. En ambos trabajos aparece una atrofia selectiva de las fibras tipo IIB.

Langohr y cols., (1983) aunque señalan cambios en el área de las fibras musculares de biopsias de vasto lateral de alcohólicos, indican que el porcentaje de fibras no varía. Nuestros resultados están de acuerdo con estos autores y el porcentaje de fibras no varía por la administración de etanol.

Cuando se consideran conjuntamente alcohol y ejercicio, si se ven afectados los músculos con mayoría de fibras tipo II (gastrocnemio mixto y plantaris) (tablas XVI y XVII). En el caso del plantaris aumenta de forma significativa la proporción de fibras tipo I, se produce un descenso no significativo de las fibras tipo IIB mientras que la proporción de fibras IIA no varía. Este resultado está de acuerdo con las variaciones en las actividades enzimáticas descritas para este músculo por efecto del alcohol y del ejercicio en las que se observaban incrementos significativos en la actividades citrato sintasa (tabla X) y -hidroxi-Acil-CoenzimaA-deshidrogenasa (tabla XI) y descensos en la actividades glucolíticas: lactato deshidrogenasa (tabla XIII) y piruvato kinasa (tabla XIV).

En el gastrocnemio mixto ocurre un aumento significativo del porcentaje de fibras tipo IIA en detrimento de las IIB pero el cambio parece estar más relacionado con el efecto del ejercicio.

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
G Rojo				
I	48,51 ± 4,83	51,57 ± 6,61	51,93 ± 5,06	48,49 ± 5,16
IIA	30,28 ± 3,51	29,18 ± 4,15	28,20 ± 2,63	29,86 ± 3,49
IIB	21,21 ± 3,40	19,26 ± 3,21	19,88 ± 4,32	21,65 ± 2,98
G Mixto				
I	12,9 ± 3,1	12,4 ± 1,9	14,4 ± 2,0	12,8 ± 2,8
IIA	23,1 ± 5,2	18,2 ± 1,5	23,4 ± 2,2	23,0 ± 5,0 ^b
IIB	65,0 ± 4,1	70,0 ± 1,2	62,2 ± 1,3	65,2 ± 4,2 ^{bc}

^b Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

^c Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XVI. Valores medios y DS de la distribución en porcentaje (%) de los distintos tipos fibrilares en el gastrocnemio rojo y mixto. El porcentaje se ha obtenido mediante recuento directo en preparaciones teñidas con la técnica ATPasa pH 4,6.

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
Plantaris				
I	13,8 ± 2,2	15,5 ± 1,8	14,0 ± 1,3	17,4 ± 3,2 ^c
IIA	33,2 ± 4,9	27,4 ± 1,6	29,4 ± 4,8	29,4 ± 4,2
IIB	53,0 ± 4,9	57,1 ± 1,6	56,6 ± 4,3	53,3 ± 2,4
Sóleo				
I	97,0 ± 4,4	97,6 ± 3,3	96,7 ± 5,0	100 ± 0,0
IIA	3,0 ± 4,4	2,4 ± 3,3	3,3 ± 5,0	0,0 ± 0,0

^c Diferencias significativas (p<0,05) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XVII. Valores medios y DS de la distribución en porcentaje (%) de los distintos tipos fibrilares en el plantaris y sóleo. El porcentaje se ha obtenido mediante recuento directo en preparaciones teñidas con la técnica ATPasa pH 4,6.

Se ha descrito que el ejercicio puede aumentar la capacidad oxidativa de las fibras glucolíticas (tipo IIB) en ejercicios muy intensos (Rivero y cols., 1993). Con objeto de evidenciar estos cambios se realizó la tinción oxidativa NADH-TR en los músculos susceptibles de presentar tales cambios, gastrocnemio blanco (LÁMINA 5) y plantaris. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla siguiente. En ella se observa que no existen cambios significativos, por lo tanto el ejercicio realizado no modificó el potencial oxidativo de estas fibras.

	Gastrocnemio Blanco		Plantaris	
	%FG	%FOG	%FG	%FOG
Control	75,95 ± 4,0	24,5 ± 4,0	34,1 ± 3,05	65,9 ± 3,05
Etanol	76,83 ± 2,59	23,13 ± 2,59	37,47 ± 5,55	62,53 ± 5,55
Ejercicio	80,24 ± 2,29	19,76 ± 2,29	34,97 ± 2,92	65,03 ± 2,92
Etanol-ejercicio	78,81 ± 2,28	21,19 ± 2,28	34,35 ± 1,02	65,65 ± 1,02

Tabla XVIII. En la tabla se recogen los valores medios y las desviaciones estándar de los porcentajes de los tipos fibrilares obtenidos a través de la técnica NADH-TR, en la porción blanca del gastrocnemio y en el plantaris.

4.9. Análisis morfométrico

Antes de describir el efecto de los distintos tratamientos sobre la morfometría de las zonas musculares estudiadas, se comentaran los valores de las áreas de las fibras en los distintos músculos. Numerosos autores han descrito la relación del área de un tipo fibrilar con el porcentaje de ese tipo en el músculo y con su localización en la zona de estudio. De acuerdo con este criterio, las fibras de tipo I muestran áreas mayores en el músculo sóleo ($3.789 \pm 153 \mu\text{m}^2$) (tabla XIX) en el que están presentes en un porcentaje muy elevado (entre un 97-100%) frente a un área de las mismas en el plantaris de $2.754 \pm 222 \mu\text{m}^2$ (tabla XX) en el que están presentes en un 13%. Las fibras IIA poseen áreas de 2.117 ± 216 - $2.513 \pm 184 \mu\text{m}^2$, (tablas XX y XXII) y la variación de su porcentaje es menor, un 32% en el músculo plantaris y un 23% en el gastrocnemio mixto. Las áreas de las fibras IIB están en relación a su presencia dentro del músculo, presentando un área de $4.554 \pm 482 \mu\text{m}^2$ (tabla XIX) en el gastrocnemio blanco (con un porcentaje cercano al 100% de este tipo de fibras) y alrededor de $3.300 \mu\text{m}^2$ (tablas XX y XXII) en el plantaris y gastrocnemio mixto (con presencia de un 53 y un 65% respectivamente) y $2.472 \pm 480 \mu\text{m}^2$ (tabla XXI) en el gastrocnemio rojo (con un porcentaje del 21%).

Como se ha comentado en el apartado correspondiente de la revisión bibliográfica existen discrepancias en cuanto a las variaciones del área de las fibras por efecto del ejercicio. Nuestros resultados muestran que el ejercicio no produce variaciones significativas en las áreas de las fibras en el sóleo y gastrocnemio blanco (tabla XIX) y gastrocnemio mixto (tabla XXII). El único cambio significativo se manifiesta en las fibras de tipo I en el plantaris (tabla XX) que sufren una disminución del área pasando de $2.754 \pm 222 \mu\text{m}^2$ en el control a $1.968 \pm 256 \mu\text{m}^2$ en el grupo entrenado. En el gastrocnemio rojo también hay cambios que si bien no son significativos en las áreas sí lo son en los perímetros de las fibras, estos cambios consisten en una disminución del tamaño de las fibras tipo I frente a un incremento de las de tipo II (tabla XXI).

En general, el ejercicio en nuestras condiciones experimentales provoca una disminución de las fibras de tipo I, similares resultados han sido obtenidos por Bayón (1992), realizando el mismo protocolo de ejercicio en ratas adultas, no obstante en estos resultados también disminuyen las fibras IIA señalándose un efecto selectivo sobre las fibras oxidativas. Cuando se expusieron los resultados relativos al peso de los músculos (tabla I), se observó un descenso significativo en el peso del sóleo por efecto del ejercicio, este descenso puede ser indicativo de la reducción del área de las fibras de tipo I.

La respuesta de las fibras glucolíticas es la inversa, ya que el ejercicio aumenta el área de las fibras IIB en el gastrocnemio blanco aunque la variación no es significativa (tabla XIX).

Los efectos del alcohol sobre el contenido proteico en músculos con fibras de tipo I o de tipo II han sido estudiados por diversos autores. Preedy y cols., (1988) señalan que en ratas la ingesta de alcohol disminuye el peso del músculo, el contenido proteico y los contenidos en ADN y ARN, mostrando los músculos con mayoría de fibras de tipo II, los mayores cambios. Cuando se comparan músculos con distinto porcentaje de fibras tipo I y II la disminución de la síntesis proteica es mas acusada en plantaris que en el sóleo y ambas sustancias, etanol y acetaldehido son responsables del efecto aunque por mecanismos independientes (Conde y cols., 1992, Preedy y cols; 1992).

Nuestros resultados están de acuerdo con estas afirmaciones ya que la tendencia es la disminución del área en las fibras de tipo II, salvo en el plantaris en el que el alcohol disminuye significativamente el área de los tres tipos de fibras, aproximadamente un 30% cada subtipo fibrilar (figura 11).

El porcentaje de disminución del área de las fibras de tipo II oscila entre un 13 y un 16% en el gastrocnemio mixto y entre un 9 y un 13% en el gastrocnemio rojo. El área de las fibras de tipo I disminuye un 10% en los músculos sóleo, gastrocnemio rojo y mixto por efecto de la administración de alcohol. El área de las fibras mayoritarias en el gastrocnemio blanco (tipo IIB) no se modifica por acción del etanol.

La variación del área de las fibras por efecto del alcohol ha sido estudiada por Langohr y cols., (1983), que describen en vasto lateral obtenido de biopsias de alcohólicos una disminución del diámetro de las fibras de tipo II y aumento en el diámetro de las fibras de tipo I, los autores relacionan la atrofia muscular con alteraciones en el metabolismo glucolítico y daño neurogénico. Conde y cols., (1992) asocian la atrofia de las fibras que se produce en ratas a las que se les administra etanol con deficiencias nutricionales, aunque la desnutrición provoca una disminución en el área de las fibras de tipo I que no ocurre con el alcohol.

Lo más relevante de nuestros resultados se refiere a la acción selectiva del alcohol en los músculos, así, el plantaris es un músculo diana en el que existe reducción del área fibrilar

en los tres tipos de fibra. Este músculo se caracteriza por un porcentaje alto de fibras de tipo II (un 86%), y el alcohol afecta de forma predominante a este tipo de fibras, no obstante, la porción del gastrocnemio estudiada como gastrocnemio mixto con una composición porcentual similar no está tan afectada por el etanol como el plantaris y en el gastrocnemio blanco no se modifican las áreas de las fibras IIB.

Para explicar estos resultados hay que tener en cuenta que estamos comparando las variaciones en un músculo con las de zonas diferentes de otro músculo, posiblemente si observáramos el músculo en su totalidad como en el caso del plantaris, los resultados podrían indicar una atrofia más generalizada.

Por otra parte, la disminución del área de las fibras no afecta solo a las fibras rápidas con metabolismo glucolítico como se señala en la bibliografía ya que las fibras de tipo I también se ven afectadas en nuestro estudio.

En el estudio conjunto de ambos factores hay que señalar que el ejercicio facilita la eliminación del etanol y en estudios “in vitro” se ha demostrado que acelera su metabolismo por los microsomas hepáticos (Ardies y cols., 1989). Los resultados obtenidos muestran que en el plantaris el área de las fibras de tipo IIB disminuye únicamente un 13% en este grupo en comparación con un 25% en el grupo que recibe etanol, no modificándose las áreas de estas fibras en el resto de los músculos estudiados. Las fibras de tipo I que se han visto afectadas tanto por efecto del alcohol como por efecto del ejercicio, en los músculos sóleo, gastrocnemio rojo y mixto presentan el mismo comportamiento, encontrándose una reducción del área que sólo es significativa en el gastrocnemio mixto (tabla XXII y figura 12).

A este respecto Amaladevi y cols., (1995) señala que en músculos con predominancia de fibras tipo I, las contracciones musculares asociadas al ejercicio físico potencian los efectos del alcohol.

La magnitud de los cambios provocados por el ejercicio y la ingesta de alcohol, es también reseñable para el plantaris observándose una cierta reversión de la reducción del área ocasionada por el alcohol en las fibras de tipo IIB.

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
SÓLEO FIBRA TIPO I				
ÁREA	3789 ± 153	3459 ± 436	3578 ± 346	3398 ± 287
PERÍMETRO	247 ± 14,5	228 ± 14,6	253 ± 17,8	227 ± 15,4
G. BLANCO FIBRA TIPO IIB				
ÁREA	4554±482	4572±354	5202±397	4222±396 ^c
PERÍMETRO	273±13,5	255±22.4	288±10,5	255±13,9 ^c

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XIX Valores de área en μm^2 y perímetro en μm con las desviaciones estándar correspondientes (DS) correspondientes a las fibras de tipo I en el sóleo y las tipo IIB del gastrocnemio blanco. Ambos tipos de fibras se consideran como los únicos que existen en los citados músculos.

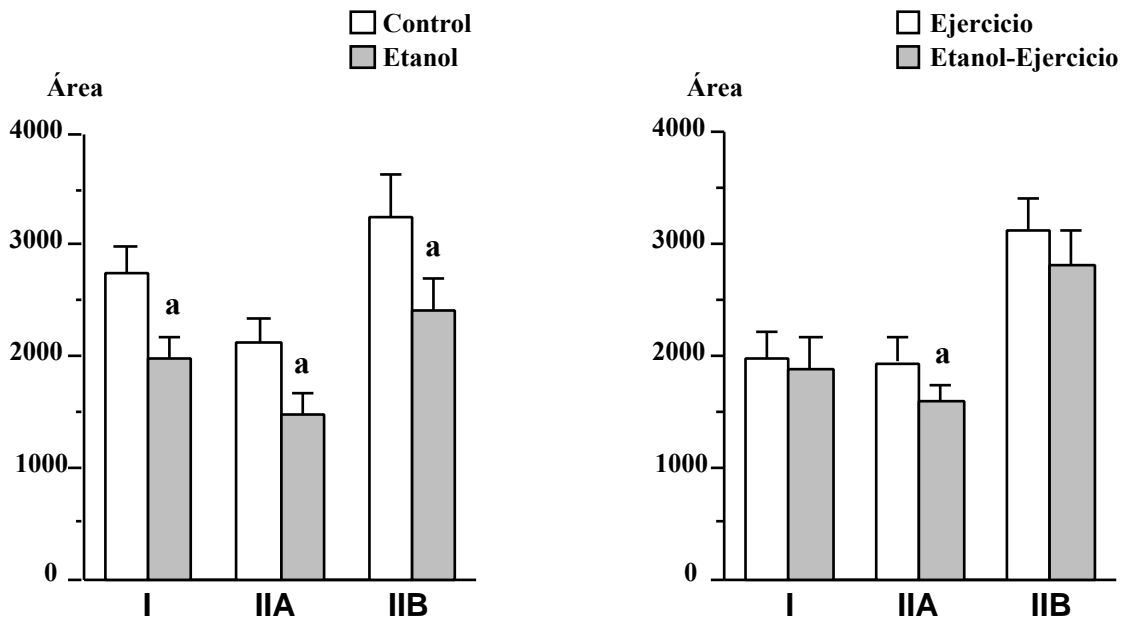
	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
ÁREA				
I	2754 ± 222	1973 ± 207 ^a	1968 ± 256 ^a	1881 ± 265
IIA	2117 ± 216	1477 ± 185 ^a	1935 ± 221	1589 ± 149 ^c
IIB	3251 ± 384	2409 ± 273 ^a	3123 ± 284	2811 ± 299
PERÍMETRO				
I	200 ± 13,9	175 ± 7,50 ^a	177 ± 11,6 ^a	164 ± 13,7
IIA	189 ± 11,3	160 ± 8,51 ^a	177 ± 10,8	162 ± 6,72 ^{bc}
IIB	242 ± 15,7	204 ± 8,36 ^a	231 ± 8,89	217 ± 15,3

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XX Valores medios de área en μm^2 y perímetro en μm con las desviaciones estándar correspondientes (DS) de los distintos tipos de fibras en el plantaris.



a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a los respectivos controles

Figura 11. Efecto del etanol en el área de los distintos tipos de fibras en el plantaris (a). En la figura b vemos como el ejercicio revierte el efecto producido por el etanol, salvo en las fibras IIA.

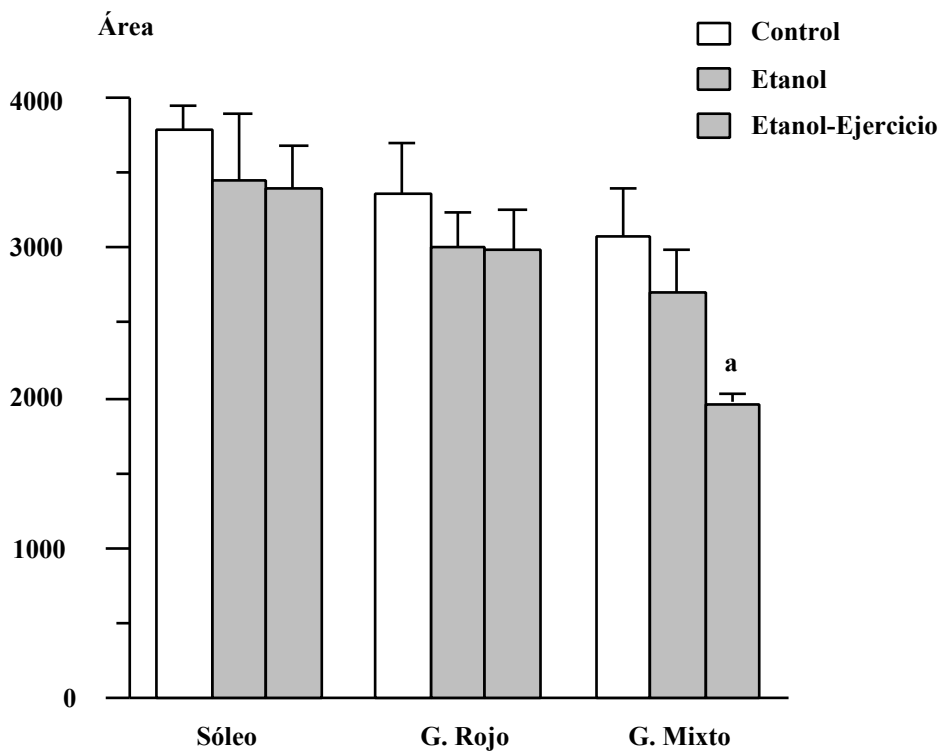


Figura 12. En la figura se observa el efecto del alcohol en el área de las fibras de tipo I que no revierte por el ejercicio, e incluso es aumentado en el gastrocnemio mixto de forma significativa.

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
ÁREA				
I	3364 ± 331	3010 ± 236	3089 ± 376	2992 ± 266
IIA	2596 ± 401	2375 ± 242	2981 ± 277	2700 ± 307
IIB	2472 ± 480	2168 ± 248	2747 ± 286	2768 ± 252
PERÍMETRO				
I	237 ± 12,7	215 ± 8,62 ^a	237 ± 13,0	229 ± 12,4
IIA	222 ± 20,3	200 ± 9,7	270 ± 18,5 ^a	247 ± 19,1 ^b
IIB	219 ± 21,7	192 ± 10,2 ^a	258 ± 14,2 ^a	246 ± 17,8 ^b

a Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo control de los grupos: etanol y ejercicio.

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XXI. Valores medios de área en μm^2 y perímetro en μm con las desviaciones estándar correspondientes (DS) de los tres tipos de fibras en el gastrocnemio rojo, en los distintos grupos estudiados.

	CONTROL	ETANOL	EJERCICIO	ETANOL-EJERCICIO
ÁREA				
I	3074 ± 325	2702 ± 287	2906 ± 212	1969 ± 57 ^{bc}
IIA	2513 ± 184	2104 ± 155	2460 ± 278	2407 ± 345
IIB	3330 ± 290	2903 ± 282	3454 ± 396	3035 ± 325
PERÍMETRO				
I	223 ± 12,4	211 ± 12,9	220 ± 9,14	181 ± 4,7 ^{bc}
IIA	200 ± 5,8	185 ± 7,45	199 ± 9,90	186 ± 18,3
IIB	232 ± 7,57	215 ± 16,0	236 ± 13,3	214 ± 20,8

b Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo etanol del grupo etanol-ejercicio.

c Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al grupo ejercicio del grupo etanol-ejercicio.

Tabla XXII. Valores medios de área en μm^2 y perímetro en μm con las desviaciones estándar correspondientes (DS) de los tres tipos de fibras en el gastrocnemio mixto, en los distintos grupos estudiados.

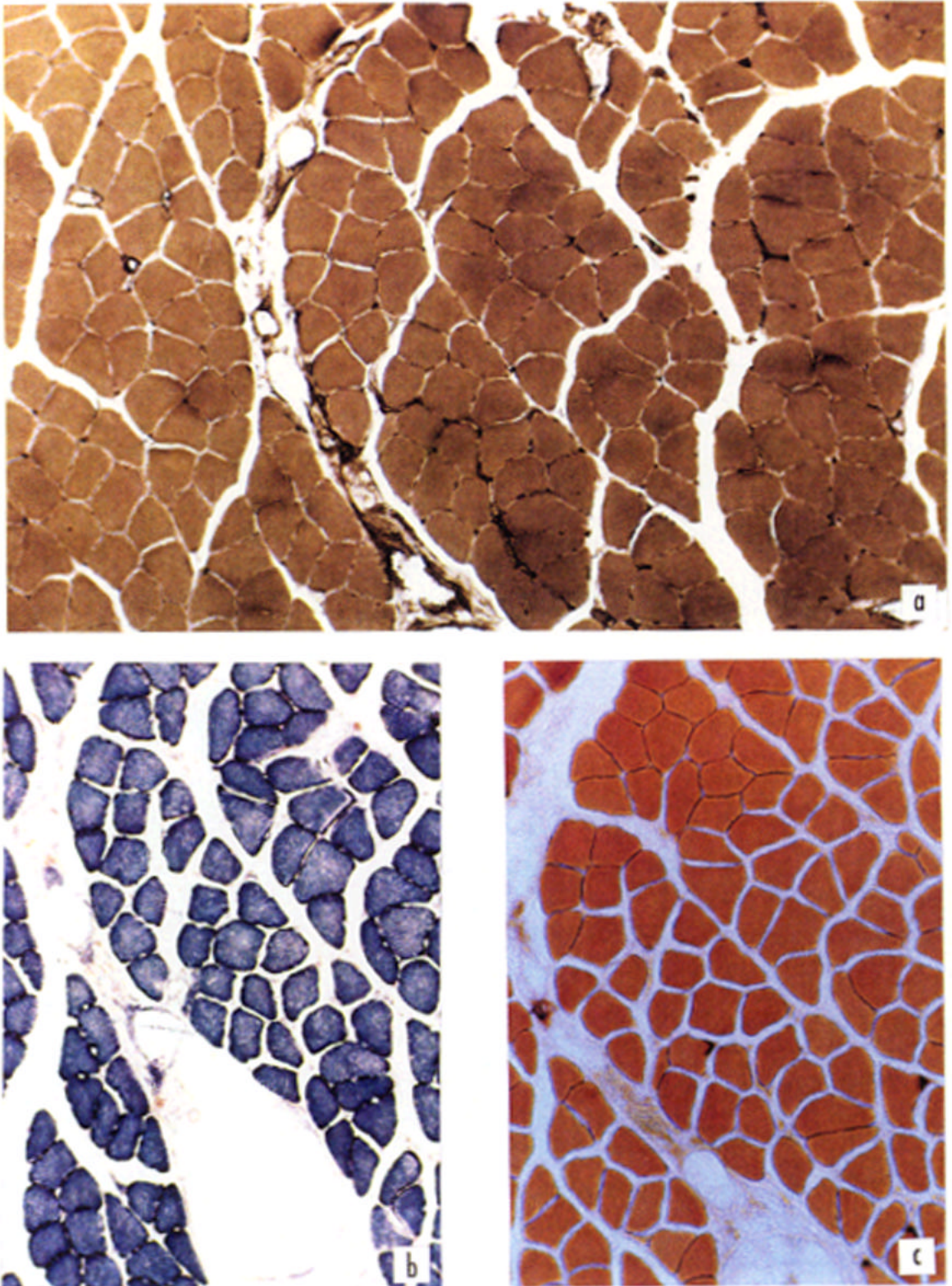


LÁMINA 3. Fotografías correspondientes al músculo sóleo (x200). Los cortes que se visualizan están realizados mediante las tinciones *ATPasa* pH 4,6; (a), *NADH-TR* (b) y *Esterasa* (c). La homogeneidad de la composición fibrilar del sóleo (fibras tipo I) se manifiesta en estas fotografías.

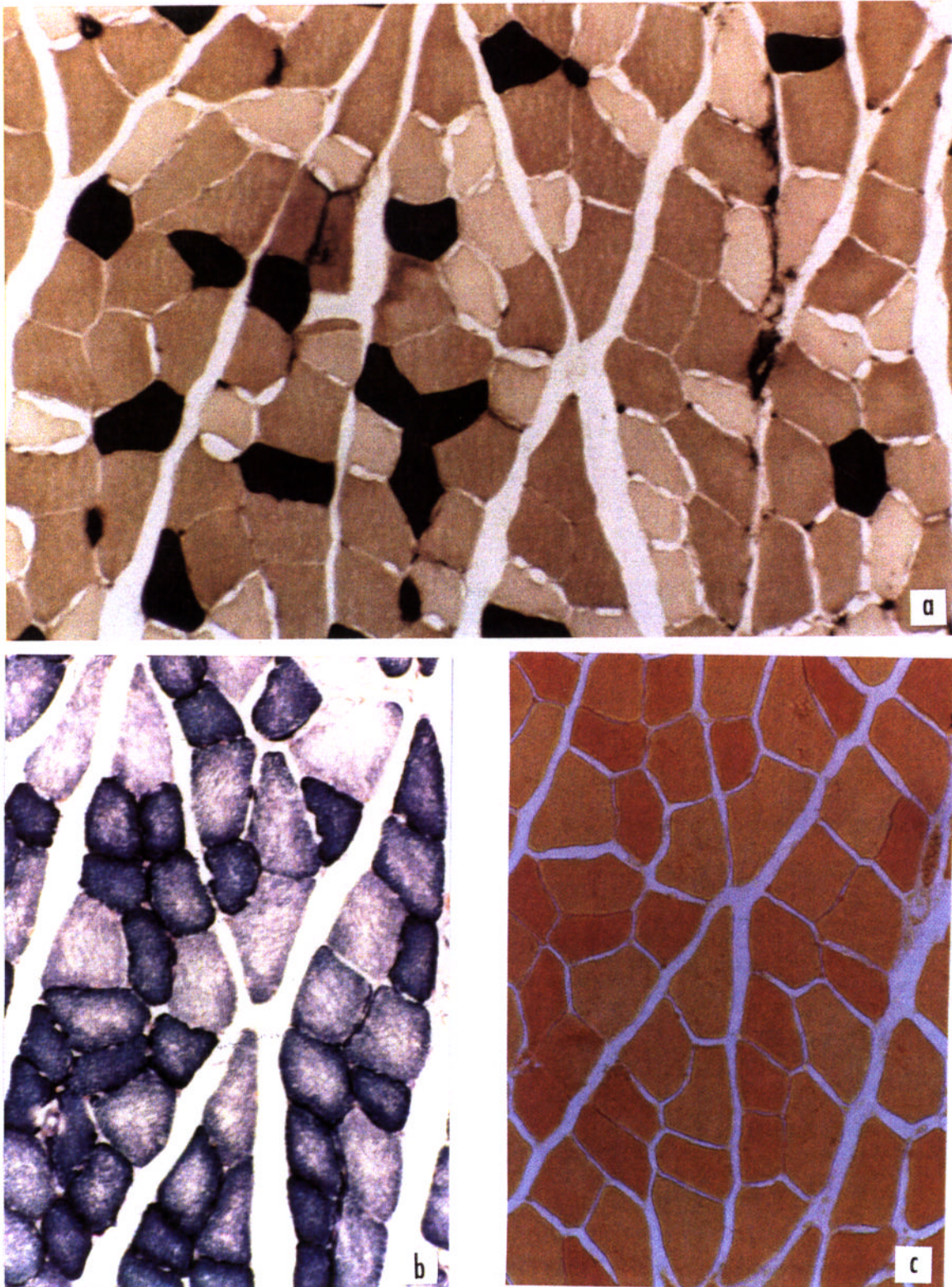


LÁMINA 4. Fotografías correspondientes al músculo plantaris (x200). Los cortes que se visualizan están realizados mediante las tinciones: *ATPasa* pH 4,6 que discrimina las fibras de tipo I (fuertemente teñidas), IIA (claras) y IIB (intermedias) (a), *NADH-TR*, con esta tinción las fibras glucolíticas aparecen poco teñidas frente a las fibras oxidativas fuertemente teñidas (b) y *Esterasa*. Tinción relacionada con el contenido lipídico de las fibras (c).

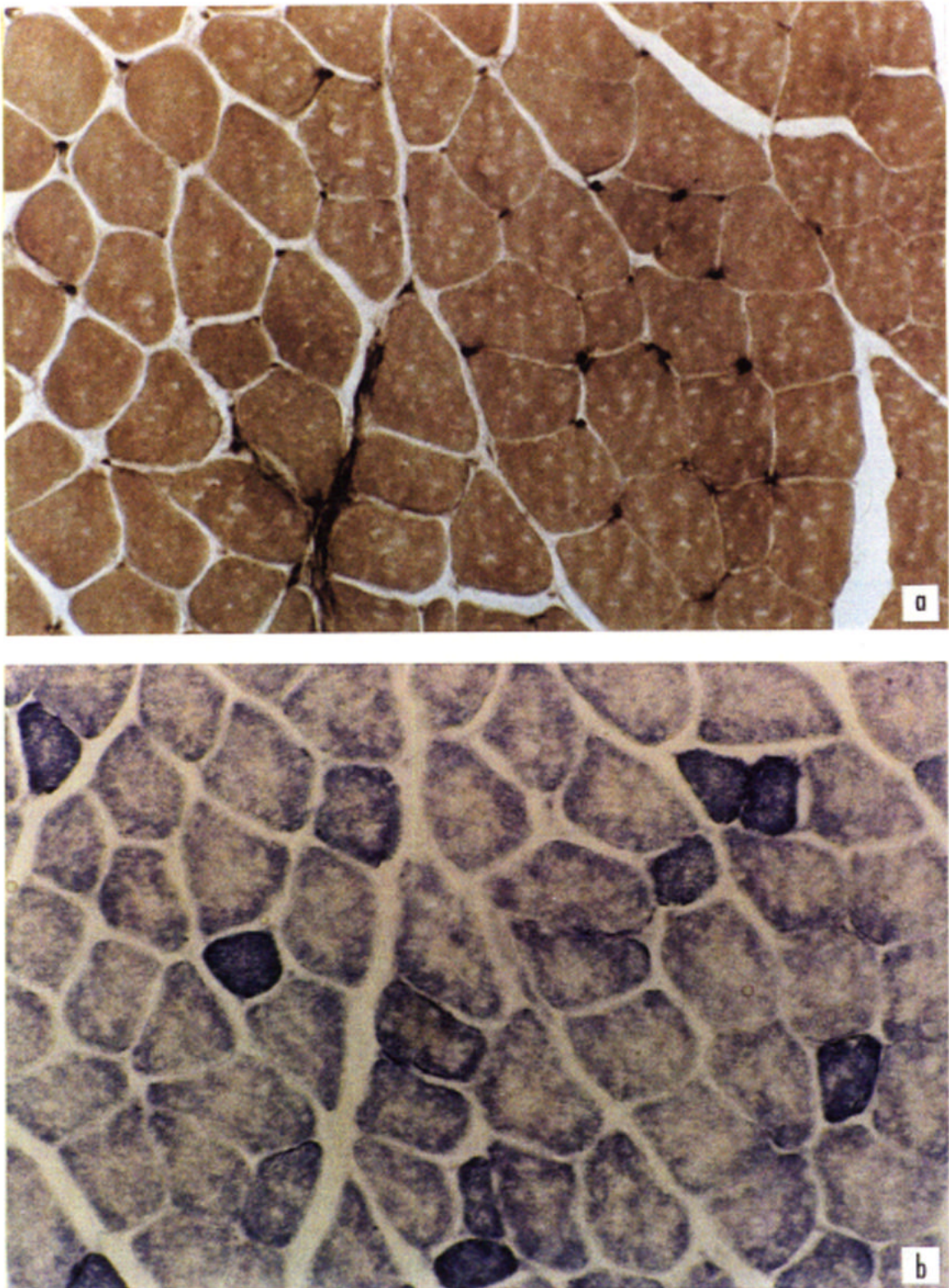


LÁMINA 5. Fotografías correspondientes al gastrocnemio blanco (x200). Los cortes que se visualizan están realizados mediante las tinciones *ATPasa* pH 4,6 (las fibras que se observan son las IIB) (**a**), *NADH-TR* (**b**). con esta tinción se evidencia la capacidad oxidativa de algunas de las fibras de tipo IIB en la rata.

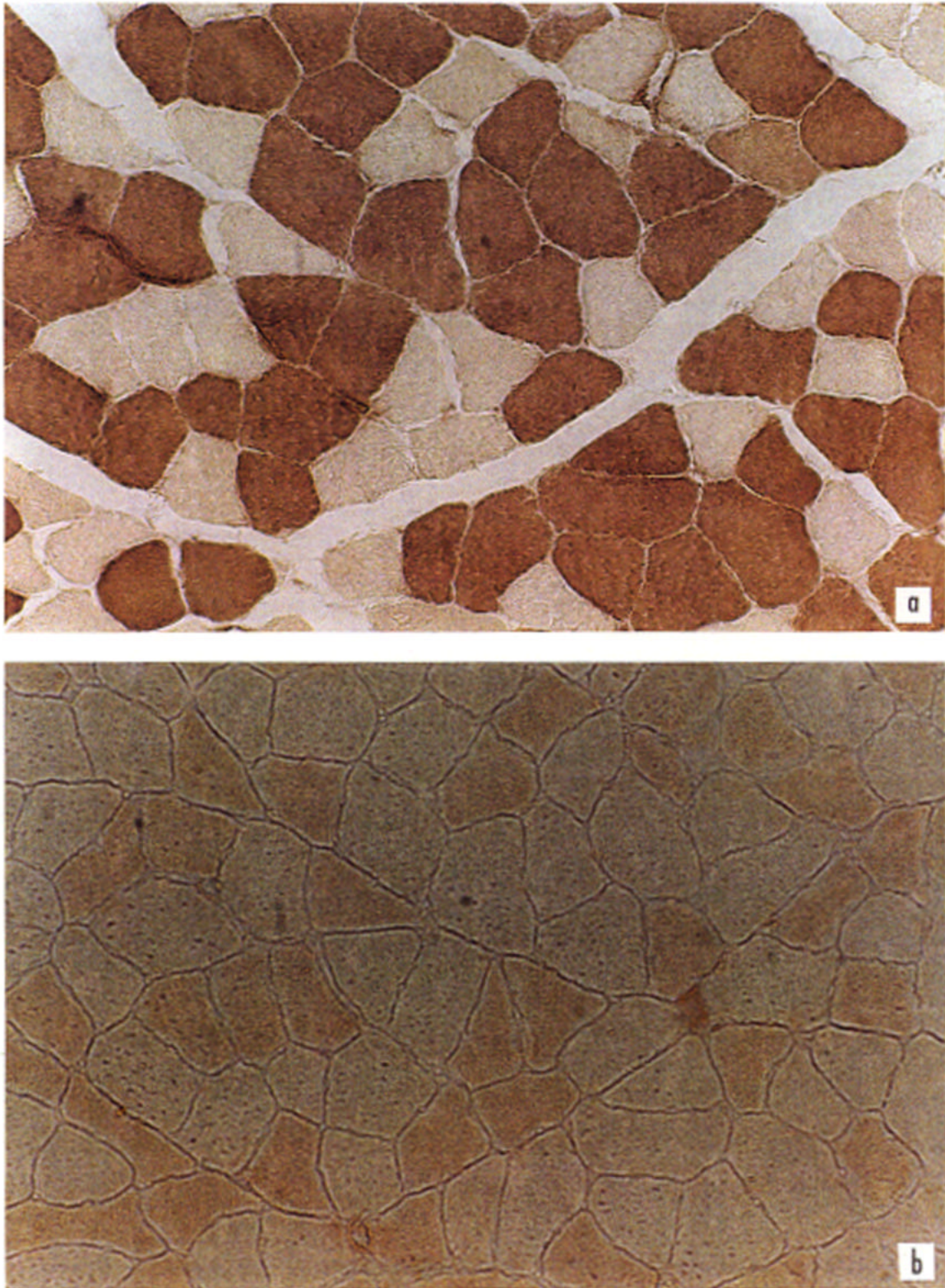


LÁMINA 6. Fotografías correspondientes al gastrocnemio rojo (x200). Los cortes que se visualizan están realizados con las técnicas ATPasa pH 4,5 (**a**) e inmunoperoxidasa con antimiosina rápida (**b**). La técnica inmunohistoquímica muestra fibras de tipo I (claras) que se corresponden en la técnica histoquímica con las fibras intensamente teñidas.

5. Conclusiones

1. El peso de los animales que ingieren alcohol es menor que el de los controles a lo largo de todo el experimento, siendo estas diferencias significativas únicamente al final del tratamiento, para el grupo etanol-ejercicio.

2. De todos los parámetros bioquímicos estudiados, la concentración plasmática de triglicéridos es el único que disminuye con el ejercicio independientemente de la ingestión de alcohol. El descenso de triglicéridos coincide en ambos grupos con menores pesos corporales.

3. Los efectos más importantes inducidos por el alcohol se manifiestan durante el primer mes en el que existe un mayor consumo del mismo. La actividad lactato deshidrogenasa se induce durante dicho periodo en el grupo que ingiere alcohol y realiza ejercicio. No obstante, los valores de CPK no se han alterado en ningún grupo durante el período experimental, lo que nos permite descartar daño muscular.

4. Teniendo en cuenta los niveles de transaminasas detectados tras el periodo de alcoholización, no podemos considerar la existencia de daño hepático producido por la ingestión crónica de alcohol, aunque la actividad -GT aumenta significativamente después del primer mes de tratamiento.

5. En relación a los parámetros hematológicos, el etanol no altera el número de eritrocitos descartándose las carencias nutricionales asociadas a la aparición de anemia.

6. El ejercicio sí modifica los valores de hemoglobina, hematócrito y recuento eritrocitario al finalizar el primer mes de entrenamiento, teniendo lugar un descenso de los mismos debido a la destrucción de hematíes por lesión mecánica. El recambio eritrocitario concomitante se manifiesta por un aumento de la resistencia eritrocitaria.

7. Los depósitos de glucógeno hepático aumentan en los animales que realizan ejercicio y disminuyen con la ingesta de alcohol. El efecto conjunto de alcohol y ejercicio no modificó significativamente la concentración de glucógeno en el hígado.

8. Las fibras glucolíticas de la rata presentan un potencial oxidativo, medido por la actividad NADH-TR, moderadamente alto y el ejercicio no varía esta capacidad.

9. La variación de las actividades enzimáticas musculares refleja que el ejercicio realizado ha sido de baja intensidad. De todas las enzimas estudiadas la hexoquinasa es la que mas se ha inducido en nuestras condiciones experimentales.

10. El ejercicio potencia los efectos del alcohol en cuanto al incremento de la captación de glucosa por el músculo, siendo sóleo, gastrocnemio rojo y gastrocnemio blanco los músculos afectados.

11. La capilaridad aumenta por efecto del ejercicio en el sóleo y plantaris. Por otra parte el alcohol disminuye la capilaridad en el gastrocnemio blanco siendo ambos efectos significativos. El ejercicio revierte en cierta medida la restricción causada por el alcohol.

12. El entrenamiento no varia el porcentaje de los distintos tipos de fibras en los músculos estudiados. En el plantaris aumenta de forma significativa el porcentaje de las fibras de tipo I por efecto conjunto del alcohol y el entrenamiento.

13. Existe una tendencia a la disminución del área de las fibras de tipo I asociada al ejercicio. El alcohol disminuye las áreas de las fibras de tipo II, salvo en el plantaris que disminuyen los tres tipos. Se puede considerar a este músculo diana en la acción del alcohol ya que los tres tipos de fibras se ven afectados.

6. Bibliografía

- Aberle, E.D., Judge, M.D., Kirham, W.W., Page, E.H. y Crawford, B.H.** (1976). Fiber types and size in equine esqueletal muscle. *Am. J. Vet. Res.* 37:145-148.
- Abernethy, P.J., Thayer, R. y Taylor, A.W.** (1990). Acute and chronic responses of skeletal muscle to endurance and sprint exercise. A review. *Sports Medicine* 10:365-389.
- Adolfsson, J., Ljungquist, A., Torning, G. y Unge, G.** (1981). Capillary increase in the skeletal muscle of trained young and adult rats. *J. Physiol.* 310:532-592.
- Alnaqeeb, M.A. y Goldspink, G.** (1987). Changes in fibre type, number and diameter in developing and agein skeletal muscle. *J. Anat.* 153:31-45.
- Altura, B.M., Altura, B.T. y Gebrewold, A.** (1990). Comparative effects of ethanol, acetaldehyde and acetate on arterioles and venules in skeletal muscle: direct in situ studies on the microcirculation and their possible relationship to alcoholic myopathy. *Microcirc. Endoth. Lymphatics.* 6:107-126.
- Amaladevi, B., Pagala, S., Pagala, M., Namba, T. y Grob, D.** (1995). Effect of alcohol and electrical stimulation on leakage of creatine kinase from isolated fast and slow muscles of rat. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 19:147-152.
- Andersen, P.** (1975). Capillary density in skeletal muscle of man. *Acta. Physiol. Scand.* 95:203-205.
- Andersen, P. y Henriksson, J.** (1977). Capillary supply of the quadriceps femoris muscle of man: adaptative response to exercise. *J. Physiol.* 270:677-690.
- Anderson, R., Cohen, M., Haller, R., Elms, J., Carter, N.W. y Knochel, J.P.** (1980). Skeletal muscle phosphorus and magnesium deficiency in alcoholic myopathy. *Miner. Electrolyte. Metab.* 4:106-112.
- Andreas, F.M. y Spurgeon, T.L.** (1986). Histochemical staining characteristic of normal horse skeletal muscle. *Am. J. Vet. Res.* 47:1843-1852.
- Ansved, T. y Larsson, L.** (1989). Effects of agein on enzyme-histochemical, morphometrical and contractile properties of the soleus muscle in the rat. *J. Neurol. Sci.* 93:105-124.
- Antonio, J.A. y Gonyea, W.J.** (1993). Skeletal muscle fiber hyperplasia. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25:1333-1345.

- Apple, F.S., Rogers, M.A. y Ivy, J.L.** (1986). Creatine kinase isoenzyme MM variants in skeletal muscle and plasma from marathon runners. *Clin. Chem.* 32:41-44.
- Ardies, C.M., Morris, G.S. Erickson, C.K. y Farrar, R.P.** (1989). Both acute and chronic exercise enhance in vivo ethanol clearance in rats. *J. Appl. Physiol.* 66:555-560.
- Ariano, M.A., Armstrong, R.B. y Edgerton, V.R.** (1973). Hindlimb muscle fiber in five mammals. *J. Histochem. Cytochem.* 21:51-55.
- Armstrong, R.B.** (1980). Properties and distributions of the fiber types in the locomotory muscles of mammals. *Comparative Physiology: Primitive mammals.* (Ed). Schmidt-Neilsen, K. and C.R. Taylor. Ed. Cambridge. 243-254.
- Armstrong, R.B.** (1981). Recruitment of muscles and fibers within muscles in running animals. In: *Simposia of the Zoological Society of London.* (Ed). Day, M.H. *Academy Press*, N.Y. 289-304.
- Armstrong, R.B.** (1988). Muscle fiber recruitment patterns and their metabolic correlates. In *Exercise, Nutrition and Energy Metabolism.* (Eds). Horton, E.S. and R.L. Terjung. Macmillan Publis. Co. N.Y. 9-27.
- Armstrong, R.B. y Laughlin, M.H.** (1983). Is rat soleus muscle recruited during swimming?. *Brain. Res.* 258:173-176.
- Armstrong, R.B. y Phelps, R.O.** (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171:259-272.
- Armstrong, R.B., Saubert, C.W., Seeherman, H.J. y Taylor, C.R.** (1982). Distribution of fiber types in locomotory muscles of dogs. *Am. J. Anat.* 163:87-98.
- Arndt, T. y Pepe, F.A.** (1975). Antigenic specificity of red and white muscle myosin. *J. Histochem. Cytochem.* 23:159-168.
- Ashmore, C.R. y Doerr, L.** (1971). Comparative aspects of muscle fiber types in different species. *Exp. Neurol.* 31:408-408.
- Ashmore, C.R., Addis, P.B. y Doerr, L.** (1972). Postnatal development of muscle fibre types in domestic animals. *J. An. Sci.* 34:37-41.
- Aström, K.E.** (1970). Metabolic myopathies. *Acta. Neurol. Scand.* 46:177-193.
- Bagby, G.J., Sembrowich, P.D. y Gollnick, P.D.** (1972). Myosin ATPase and fiber composition from untrained and trained rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 223:1415-1417.
- Baldwin, K.M., Klinkerfuss, G.H., Terjung, R.L., Mole, P.A. y Holloszy, J.O.** (1972). Respiratory capacity of white, red and intermediate muscle: adaptative response to exercise. *Am. J. Physiol.* 222:373-378.
- Baldwin, K.M., Winder, W.W., Terjung, R.L. y Holloszy, J.O.** (1973). Glycolitic enzymes in different types of skeletal muscle: adaptation to exercise. *Am. J. Physiol.* 225:962-966.
- Banchero, N., Gimenez, M., Aquin, L. y Flotentz, M.** (1979). Effects of exercise on capillariry and enzymatic activity of rat skeletal muscle. *Bull. Eur. Physiopath. Res.* 15:203-216.

- Barany, M.** (1967). ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* 56:197-218.
- Baraona, E. y Lieber, C.S.** (1979). Effects of ethanol on lipid metabolism. *J. Lipid. Res.* 20:289-315.
- Barnard, R.J. y Peter, B.** (1969). Effect of training and exhaustion on hexokinase activity of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 27:691-695.
- Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Furukawa, T. y Peter, J.B.** (1970). Effect of exercise on skeletal muscle. I. Biochemical and Histochemical properties. *J. Appl. Physiol.* 28:762-766.
- Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Furukawa, T. y Peter, J.B.** (1971). Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.* 220:410-414.
- Barriga, C., Campillo, J.E. y Ortega, E.** (1992). Aspectos inmunológicos de la actividad física. En: *Fisiología de la actividad física y del deporte*. (Ed). González-Gallego, J. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid. 161-174.
- Bass, A., Brdiczka, D., Eyer, P., Hofer, S. y Pette, D.** (1969). Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur. J. Biochem.* 10:198-206.
- Bass, A., Gutmann, E. y Hanzlikova, V.** (1975). Biochemical and histochemical changes in energy supply-enzyme pattern of muscle of the rat during old age. *Gerontology.* 21:215-223.
- Bassett., D.R.** (1994). Skeletal muscle characteristics: relationships to cardiovascular risk factors. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 26:957-966.
- Bayón, J.E.** (1992). Efectos del estanozolol y L-carnitina sobre diversos parámetros fisiológicos en ejercicio aeróbico. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de León.
- Bayón, J.E., Alvarez, A.I., Barrio, J.P., Díez, C. y Prieto, J.G.** (1993). Effects of stanozolol and L-carnitine on erythrocyte osmotic fragility during aerobic exercise in rats. *Comp. Haematol. Int.* 3:196-200.
- Beard, J.D. y Knott, D.H.** (1966). Hematopoietic response to experimental chronic alcoholism. *Am. J. Med. Sci.* 252:518-595.
- Beck, I.T., Paloschi, G.B., Dinda, P.K. y Beck, M.** (1979). Effect of intragastric administration of alcohol on the ethanol concentrations and osmolarity of pancreatic juice, bile, and portal and peripheral blood. *Gastroenterology.* 67:484-489.
- Bennion, L.J. y Li, T.K.** (1976). Alcohol metabolism in American Indians and whites. Lack of racial differences in metabolic rate and liver alcohol dehydrogenase. *N. Engl. J. Med.* 294:9-13.
- Bergmeyer, H.U.** (1974a). Hexokinase. In: *Methods of enzymatic analysis*. (Ed). Bergmeyer, H.U. 2nd Ed. Academic Press, Inc. N.Y. 1:473.

- Bergmeyer, H.U.** (1974b). Pyruvate Kinase. In *Methods of enzymatic analysis*. (Ed). Bergmeyer, H.U. 2nd Ed. Academic Press, Inc. N.Y. 1:509-510.
- Billeter, R., Weber, H., Lutz, H., Howald, H., Eppenber, H.M. y Jenny, E.** (1980). Myosin types in human skeletal muscle fibres. *Histochemistry*. 65:249-259.
- Blomstrang, E. y Ekblom, B.** (1982). The needle biopsy techniques for fibre type determination in human skeletal muscle. A methodological study. *Acta Physiol. Scand.* 116:437-442.
- Boyd, J.W.** (1983). The mechanism relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in diseases of animals. *Vet. Clin. Pathol.* 12:9-24.
- Bosron, W.F. y Li, T.K.** (1987). Catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase isoenzymes. *Enzyme*. 37:19-28.
- Boveris, A., Oshino, H. y Chance, B.** (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 128:617-630.
- Bradshaw, R.A. y Noyes, B.E.** (1975). 3-Hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase from Pig Heart Muscle. In *Methods in Enzymology*. (Ed). Lowenstein, J.M. Academic Press, Inc. N.Y. 35:122-128.
- Brodal, P., Ingjer, F. y Hermansen, L.** (1977). Capillary supply of skeletal muscle fibers in untrained and endurance trained men. *Am. J. Physiol.* 232:705-712.
- Brooke M.H. y Kaiser, K.K.** (1970). Three "myosin ATPase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J. Histochem. Cytochem.* 18:670-672.
- Brooks, G.A. y Mercier, J.** (1994). Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossver" concept. *J. Appl. Physiol.* 76:2253-2261.
- Brotherhood, J., Brozovic, B.** (1975). Haematological status of middle-and long-distance runners. *Br. J. Mol. Med.* 48:139-145.
- Burgos-Bretones, J.B., Razquin, B. y Rivera-Pomar, J.M.** (1980). Perfil histoquímico y morfométrico del músculo tibial anterior de la rata adulta. *Morfol. Norm. Patol.* 4:1-8.
- Burgos-Bretones, J.B., Razquin, B., Villanova, R.J. y Rivera-Pomar, J.M.** (1981). Gradientes de distribución de los tipos histoquímicos de fibras en el músculo tibial anterior de la rata. *Morfol. Norm. Patol.* 5:79-85.
- Burke, R.E.** (1981). Motor units: anatomy, physiology and functional organization. Handbook of Physiology. *The Nervous System*. (Ed). V.R. Brooks. Am. Physiol. Soc., Bethesda, M.D. Sect 1, Chap. 10:345-422.
- Burke, R.E., Levine, D.N., Zajac III, F.E., Tsairis, P. y Engel. W.K.** (1971). Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science*. 174:709-712.
- Carrow, R.E., Brown, R.E. y Van Huss, W.D.** (1967). Fiber sizes and capillary to fiber ratios in skeletal muscle of exercised rats. *Anat. Rec.* 159:33-40.
- Carrow, R.E., Heusner, W.W. y Van Huss, W.D.** (1973). Exercise and the incidence of muscle fiber splitting. *Brit. Assoc. Sport. Med. J.* 7:39-41.

- Cassens, R.G.** (1970). Morphology of muscle as a food. In: *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a food*. Vol. 2. (Eds). Briskey, E.J., Cassens, R.G., and B.B. Marsh. Univ. Wisconsin. Press, Madison, WI. 679-704.
- Castelli, W.P., Gordon, T., Hortland, M.C., Kagan, A., Doyle, J.T., Hames, C.G., Hulley, S.B. y Zukel, W.J.** (1977). Alcohol and blood lipids. *Lancet*. 2:153-155.
- Clark, P.M.S., Kricka, L.J. y Zaman, S.** (1982). Drivers, binge drinking, and gamma-glutamyltranspeptidase. *Br. Med. J.* 285:1656-1657.
- Cohen, G., Sinet, P.M. y Heikkila, R.E.** (1983). Ethanol oxidation by catalase in rat brain in vivo. In: *Biological Approach to Alcoholism*. (Ed) Lieber, C.S. Washington, D.C., Research Monograph-11, DDHS Publication No. (ADM) 83-1261, Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office. 311-315.
- Conde, A., González-Reimers, E. y González-Hernández, T.** (1992). Relative and combined roles of ethanol and protein malnutrition on skeletal muscle. *Alcohol Alcoholism*. 27:159-163.
- Cook, E.B., Adebisi, L.A.Y., Preedy, V.R., Peters, T.J. y Palmer, T.N.** (1992). Chronic effects of ethanol on muscle metabolism in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*. 1180:207-214.
- Costerbosa, G.L., Barazzoni, A.M. y Lucci, M.L.** (1987). Histochemical types and sizes of fibers in the rectus abdominalis muscle of the guinea pig: adaptative response to pregnancy. *Anat. Rec.* 217:23-29.
- Costill, D.L., Daniels, J., Evans, W., Fink, W., Krahenbuhl, G. y Saltin, B.** (1976). Skeletal muscle enzymes and fiber composition in males and female track athletes. *J. Appl. Physiol.* 40:149-154.
- Costill, D.L., Fink, W.J., Getchell, L.H., Ivy, J.L. y Witzmann, F.A.** (1979). Lipid metabolism in skeletal muscle of endurance trained males and females. *J. Appl. Physiol.* 47:787-791.
- Crabb, D.W., Bosron, W.F. y Li, T.K.** (1987). Ethanol metabolism. *Pharmac. Rev.* 34:59-73.
- Cullen, M.J. y Mastaglia, F.L.** (1982). Pathological reactions of skeletal muscle. In: *Skeletal Muscle Pathology*. (Eds). Mastaglia, F.L. and J. Walton. Churchill. Livingstone.
- Chiakulas, J.J. y Pauly, J.E.** (1965). A study of postnatal growth of skeletal muscle in the rat. *Anat. Rec.* 152:55-62.
- Chui, L.A., Neustein, H. y Munsat, T.L.** (1975). Tubular aggregates in subclinical alcoholic myopathy. *Neurology*. 25:405-412.
- Danieli-Betto, D., Betto, R., Megighian, A., Midrio, M., Salviati, G. y Larsson, L.** (1995). Effects of age on sarcoplasmic reticulum properties and histochemical composition of fast-and slow-twitch rat muscles. *Acta Physiol. Scand.* 154:59-64.
- David, R. y Bassett, J.R.** (1994). Skeletal muscle characteristics: relationships to cardiovascular risk factors. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26:957-966.

- Denny-Brown, D.E.** (1929). The histological features of striated muscle in relation to its functional activity. *Proc. Royal. Soc.* 104:371-411.
- Detraglia, M., Cook, F.B., Stasiw, D.M. y Cerny, L.C.** (1974). Erythrocyte fragility in aging. *Biochim. Biophys. Acta.* 345:213-219.
- Devgun, M.S., Dunbar, J.A., Hagart, J., Martin, B.T. y Ogston, S.A.** (1985). Effects of acute and varying amounts of alcohol consumption on alkaline phosphatase, aspartate transaminase, and -glutamyltransferase. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 9:235-237.
- Dohm, J.L. y Newsholme, E.A.** (1983). Metabolic control of hepatic gluconeogenesis during exercise. *Biochem. J.* 212:633-639.
- Doriguzzi, C., Mongini, T., Palmucci, L. y Schiffer, D.A.** (1983). New method for myofibrillar Ca^{++} -ATPase reaction based on the use of metachromatic dyes: its advantages in muscle fibre typing. *Histochemistry.* 79:289-294.
- Dornhorst, A. y Ouyang, A.** (1971). Effect of alcohol on glucose tolerance. *Lancet* 2:957-959.
- Douglas, R.M., Fewings, J.D., Casley-Smith, J.R. y West, R.F.** (1966). Recurrent rhabdomyolysis precipitated by alcohol. A case report with physiological and electron microscopic studies of skeletal muscle. *Aus. Ann. Med.* 15:251-256.
- Dubowitz, V.** (1965). Enzyme histochemistry of skeletal muscle. II. Developing human muscle. *Nature.* 185:701-702.
- Dubowitz, V.** (1981). Histochemistry of Muscle Disease. In: *Disorders of Voluntary Muscle.* (Ed). Walton, J. N. Edinburgh, Churchill Livingstone, 261-295.
- Dubowitz, V. y Brooke, M.H.** (1973). Muscle biopsy: A modern approach. W.B. Saunders Co. Ltd. London.
- Dubowitz, V. y Pearse, A.E.G.** (1960). A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorilase activity in skeletal muscle. *Histochemistry.* 2:105-117.
- DuFaux, B. y Hoederath, A.** (1981). Serum ferritin, haptoglobin, and iron in middle-and long-distance runners, elite rowers, and professional racing cyclists. *In. J. Sport. Med.* 2:43-46.
- Edgerton, V.R.** (1970). Morphology and histochemistry of the soleus muscle from normal and exercised rats. *Am. J. Anat.* 127:81-88.
- Edgerton, V.R. y Simpson, D.R.** (1971). Dynamic and metabolic relationship in the rat extensor digitorum longus muscle. *Exp. Neurol.* 30:374-376.
- Edgerton, V.R., Gerchman, L. y Carrow, R.** (1969). Histochemical changes in rat skeletal muscles after exercise. *Exp. Neurol.* 24:110-123.
- Edgerton, V.R., Simpson, D.R., Barnard, R.J. y Peter, J.B.** (1970). Phosphorilase activity in acutely exercised muscle. *Nature.* 225:866-867.
- Edgerton, V.R., Barnard, R.J., Peter, J.B., Gillespie, C.A. y Simpson, D.R.** (1972). Overloaded skeletal muscles of a nonhumane primate (*Galago senegalensis*). *Exp. Neurol.* 37:322-339.

- Ekbom, K., Hed, R., Kirstein, L. y Astrom, K.E.** (1964). Muscle affections in chronic alcoholism. *Arch. Neurol.* 10:449-458.
- Elder, G.C.B., Bradbury, K. y Roberts, R.** (1982). Variability of fiber type distributions within human muscles. *J. Appl. Physiol.* 53:1473-1480.
- Engel, W.K.** (1962). The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology.* 12:778-794.
- Eriksson, B.O., Gollnick, P.O. y Saltin, B.** (1973). Muscle metabolism and enzyme activities after training in boys 11-13 years old. *Acta Physiol. Scand.* 87:485-497.
- Essen, B.** (1977). Intramuscular substrate utilization during prolonged exercise. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 301:30-43.
- Essen-Gustavsson, B. y Lindholm, A.** (1985). Muscle fiber characteristics of active and inactive standardbred horses. *Equine Vet. J.* 17:434-438.
- Essen-Gustavsson, B., Karlstrom, K. y Lindholm, A.** (1984). Fibre types, enzyme activities and substrate utilization in skeletal muscles of horses competing in endurance rides. *Equine Vet. J.* 16: 197-202.
- Evarts, E.V.** (1979). Mecanismos cerebrales del movimiento. *Investigación y ciencia.* 38:117-126.
- Fahlgren, H., Hed, R. y Lundmark, C.** (1957). Myonecrosis and myoglobinuria in alcohol and barbiturate intoxication. *Acta Med. Scand.* 158:405-412.
- Faris, A.A. y Reyes, M.G.** (1971). Reappraisal of alcoholic myopathy, clinical and biopsy study on chronic alcoholics without muscle weakness or wasting. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 34:86-92.
- Faulkner, J.A., Maxwell, D.A., Brook, D.A. y Lieberman, D.A.** (1971). Adaptation of guinea pig plantaris fibers to endurance training. *Am. J. Physiol.* 221:291-297.
- Fisher, E.R., Punterri, A.J., Jung, Y., Corredor, D.G. y Donowski, T.S.** (1971). Alcoholism and other concomitants of mitochondrial inclusions in skeletal muscles. *Am. J. Med. Sci.* 214:97-106.
- Fitts, R.H., Booth, F.W., Winder, W.W. y Holloszy, J.O.** (1975). Skeletal muscle respiratory capacity, endurance and glycogen utilization. *Am. J. Physiol.* 228:1029-1033.
- Forman, D.T.** (1988). The effect of ethanol and its metabolites on carbohydrate, protein, and lipid metabolism. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 18:181-189.
- Fouces, V., Torrella, J.R., Palomeque, J. y Viscor, G.** (1993). A histochemical ATPase method for the demonstration of the muscle capillary network. *J. Histochem. Citochem.* 41:283-289.
- Fox, E.L.** (1984). Physiology of exercise and physical fitness. In: *Sports Medicine.* (Ed). Strauss, R.H. WB Saunders Co. Philadelphia. 381-456.
- Fox, E.L. y Mathews, D.K.** (1981). *The physiological basis of physical education and athletics.* WB Saunders Co. Philadelphia.

- Freinkel, N.H., Singer, D.L., Arky, R., Belichner, S.J., Anderson, J.B. y Silbert, C.K.** (1963). Alcohol hypoglycemia. I. Carbohydrate metabolism of patients with clinical alcohol hypoglycemia and experimental reproduction of the syndrome with pure ethanol. *J. Clin. Invest.* 42:1112-1133.
- Friedman, H.S., Geller, S.A. y Lieber, C.S.** (1982). The effect of alcohol on the heart, skeletal and smooth muscles. In: *Medical disorders of alcoholism. Pathogenesis and treatment.* (Ed). Lieber, C.S. WB Saunders Co. Philadelphia. 436.
- Gadeholt, G., Aarbakke, J., Dybing, E., Sjoblom, M. y Morland, J.** (1980). Hepatic microsomal drug metabolism, glutamyl transferase activity and in vivo antipyrine half-life in rats chronically fed an ethanol diet, a control diet and a chow diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213:196-203.
- Gauthier, G.F.** (1967). On the localization of sarcotubular ATPase activity in mammalian skeletal muscle. *Histochemistry.* 11:97-111.
- Gauthier, G.F.** (1979). Ultrastructural identification of muscle fibers types by immunocytochemistry. *J. Cell. Biol.* 82:392-400.
- Gauthier, G.F.** (1980). Distribution of myosin isoenzymes in adult and developing muscle fibers. In: *Plasticity of Muscle.* (Ed) Pette, D. W. De Gruyter. Berlín. 83-95.
- Gauthier, G.F. y Lowey, S.** (1977). Polymorphism of myosin among skeletal muscle fiber types. *J. Cell. Biol.* 74:760-779.
- Gauthier, G.F. y Lowey, S.** (1979). Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J. Cell. Biol.* 81:10-25.
- Gauthier, G.F. y Padykula, H.A.** (1965). Cytochemical studies of adenosine triphosphatase activity in the sarcoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 27:252-260.
- Gillespie, C. A., Simpson, D.R. y Edgerton, V.R.** (1970). High glycogen content of red as opposed to white skeletal muscle fibers of guinea pigs. *J. Histochem. Cytochem.* 18:552-558.
- Glenmark, B., Hedberg, G. y Jansson, E.** (1992). Changes in muscle fibre type from adolescence to adulthood in women and men. *Acta Physiol. Scand.* 146:251-259.
- Goldspink, G.** (1962). Studies of postembryonic growth and development of skeletal muscle. 1. Evidence of 2 phases in which striated muscle fibers are able to exit. *Proc. Royal. Irish Acad.* 62B:135-150.
- Goldspink, G.** (1977). Mechanics and energetics of muscle in animal of different sizes with particular reference to the muscle-fibre composition of vertebrate muscle. In: *Scale Effects in Animal Locomotion.* Acad. Press. N. Y. 37-45.
- Goldspink, G. y Howells, K.F.** (1974). Work-induced hypertrophy in exercised normal muscles of different ages and the reversibility of hypertrophy after cessation of exercise. *J. Physiol.* 239:179-193.
- Goldspink, G. y Ward, P.S.** (1979). Changes in rodent muscle fibre types during postnatal undernutrition and exercise. *J. Physiol.* 296:453-469.

- Gollnick, P.D.** (1982). Relationship of strength and endurance with skeletal muscle structure and metabolic potential. *Int. J. Sport. Med.* 3:26-32.
- Gollnick, P.D. y Hodgson, D.R.** (1986). The identification of fiber types in skeletal muscle: a continual dilemma. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 14:81-104.
- Gollnick, P.D. y Matoba, H.** (1984). Identification of fiber types in rat skeletal muscle based on the sensitivity of myofibrillar actomyosin ATPase to cooper. *Histochemistry.* 84:379-383.
- Gollnick, P.D. y Saltin, B.** (1982). Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clin. Physiol.* 2:1-12.
- Gollnick, P.D., Soule, R.G., Taylor, A.W., Williams, C. y Ianuzzo, C.D.** (1970). Exercise-induced glucogenolysis and lipolysis in the rat: hormonal influence. *Am. J. Physiol.* 219:729-733.
- Gollnick, P.D., Armstrong, R.B., Saubert IV, C.W., Piehl, K. y Saltin, B.** (1972). Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained man. *J. Appl. Physiol.* 33:312-319.
- Gollnick, P.D., Armstrong, R.B., Saltin, B. y Saubert IV, C.W.** (1973a). Effect of training enzyme activity and fiber composition of human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 34:107-111.
- Gollnick, P.D., Armstrong, R.B., Saltin, B., Saubert IV, C.W., Sembrowich, W.L., Shepherd, R.E. y Saltin, B.** (1973b). Glycogen depletion patterns in human skeletal muscle fibres during prolonged work. *Pflügers Arch.* 344:1-12.
- Gollnick, P.D., Parsons, D. y Oakley, C.R.** (1983). Differentiation of fiber types in skeletal muscle from the sequential inactivation of myofibrillar actomyosin ATPase during acid preincubation. *Histochemistry.* 77:543-555.
- Gonyea, W.J.** (1980a). Muscle fiber splitting in trained and untrained animal. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* 8:19-39.
- Gonyea, W.J.** (1980b). Role of exercise in inducing increases in skeletal muscle fiber number. *J. Appl. Physiol.* 48:421-426.
- Gonyea, W.J. y Ericson, E.C.** (1976). A experimental model for the study of exercise-induced skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* 40:630-633.
- Gonyea, W.J., Ericson, G.C. y Bonde-Petersen, F.** (1977). Skeletal muscle splitting induced by weight-lifting exercise in cats. *Acta. Physiol. Scand.* 99:105-109.
- Gonyea, W.J., Sale, D.G. y Gonyea, F.B.** (1986). Exercise induced increases in muscle fiber numbers. *Eur. J. Appl. Physiol.* 55:137-141.
- González, T.H., Molina, A., Llabrés, J., González, C.E., Pérez, H. y Meyer, G.** (1989). Effects of postnatal administration of ethanol on the muscle gastrocnemius of the albino mouse. *Drug Alcohol Dependence.* 23:137-142.
- González, E., Conde, A., Santolaria, F., Martínez, A., Rodríguez, F., González, T. y Castro, V.V.** (1993). Relative and combined roles of ethanol and protein malnutrition

on muscle zinc, potassium, copper, iron, and magnesium. *Alcohol Alcoholism*. 28:311-318.

- Gordon, G.G. y Lieber, C.S.** (1992). Alcohol, hormones and metabolism. In: *Medical and Nutritional complications of alcoholism*. (Ed). Lieber, C.S. Plenum Medical Book Company. N.Y. 55-91.
- Gorza, L.** (1990). Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 38:257-265.
- Green, H.J., Thomson, J.A., Daub, W.D., Houston, M.E. y Ranney, D.A.** (1979). Fibre composition, fibre size and enzyme activities in vastus lateralis of the elite athletic involved in high intensity exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 41:109-117.
- Green, H.J., Reichmann, H. y Pette, D.** (1983). Fibre type specific transformation in the enzyme activity pattern of rat vastus lateralis by prolonged endurance training. *Pflügers Arch.* 399:216-222.
- Green, H.J., Klug, G.A., Reichmann, H., Seedorf, V., Wiehrer, W. y Pette, D.** (1984). Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, paralbumin and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. *Pflügers Arch.* 400:432-438.
- Greenfield, N.J. y Pietruszko, R.** (1977). Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochim. Biophys. Acta.* 483:35-45.
- Grinton, S., Powers, S.K., Lawler, J., Criswell, D., Dodd, S. y Edwards, W.** (1992). Endurance training-induced increases in expiratory muscle oxidative capacity. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 5:551-555.
- Groschell-Stewart, U., Meschede, K. y Lehr, I.** (1973). Histochemical and immunochemical studies on mammalian skeletal muscle fibres. *Histochemistry.* 33: 79-85.
- Guiheneuc, P. y Bathien, N.** (1976). Two patterns of results in polyneuropathies investigated with the H reflex. Correlation between proximal and distal conduction velocities. *J Neurol. Sci.* 30:83-94.
- Gulve, E.A. y Spina, J.** (1995). Effect of 7-10 days of cycle ergometer exercise on skeletal muscle GLUT-4 protein content. *J. Appl. Physiol.* 79:1562-1566.
- Gunn, H.M.** (1978). Differences in the histochemical properties of skeletal muscles of different breeds of horses and dogs. *J. Anat.* 127:615-634.
- Guth, L. y Samaha, F.J.** (1969). Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.* 25:138-152.
- Guth, L. y Samaha, F.J.** (1970). Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* 28: 365-367.
- Gutman, E.** (1976). Neurotrophic relation. *Ann. Rev. Physiol.* 38: 177-216.
- Guy, P.S. y Snow, D.H.** (1977a). The effect of training and detraining on muscle composition in the horse. *J. Physiol.* 269:33-51.

- Guy, P.S. y Snow, D.H.** (1977b). The effect of training and detraining on lactate dehydrogenase isoenzymes in the horse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75:863-869.
- Häkkinen, K.** (1994). Neuromuscular adaptation during strength training, aging, detraining, and immobilization. *Critical Reviews in Physical and Rehabilitation Medicine.* 6:161-198.
- Häkkinen, K., Alen, M. y Komi, P.V.** (1985). Changes in isometric force-and relaxation-time, electromyographic and muscle fibre characteristic of human skeletal muscle during strength training and detraining. *Acta Physiol. Scand.* 125:573-585.
- Haller, R.G. y Drachman, B.D.** (1980). Alcoholic rhabdomyolysis: an experimental model in the rat. *Science.* 208:412-415.
- Haller, R.G. y Knochel, J.P.** (1984). Skeletal muscle disease in alcoholism. *Med. Clin. of North America.* 68:91-103.
- Hanid A., Slavin, G., Mair, W., Sowter, C., Ward, P., Webb, J. y Levi, J.** (1981). Fibre type changes in striated muscle of alcoholics. *J. Clin. Pathol.* 34:991-995.
- Haralambie, G.** (1976). Serum -glutamyl transpeptidase and physical exercise. *Clin. Chim. Acta.* 72:363-369.
- Hargreaves, M.** (1995). Skeletal muscle carbohydrate metabolism during exercise. In: *Exercise metabolism.* (Ed). Hargreaves M. Human Kinetics Publ. England. 41-73.
- Hartung, G.H., Lawrence, S.J., Reeves, R.S. y Foreyt, P.** (1993). Effect of alcohol and exercise on postprandial lipemia and triglyceride clearance in men. *Atherosclerosis.* 100:33-40.
- Hatori, K., Honda, H. y Matsuno, K.** (1995). ATP hydrolysis and sliding movement of actomyosin complex in the presence of ethanol. *J. Biochem. Tokio.* 117:264-266.
- Hearn, G.R. y Wainio, W.** (1956). Succinic dehydrogenase activity of heart and skeletal muscle of rats exercised. *Am. J. Physiol.* 185:348-380.
- Hed, R., Larsson, H. y Wahlgren, F.** (1955). Acute myoglobinuria. Report of a case with a fatal outcome. *Acta Med. Scand.* 152:459-462.
- Hed, R., Lundmark, C., Fahlgren, H. y Orell, S.** (1962). Acute muscular syndrome in chronic alcoholism. *Acta Med. Scand.* 171:585-599.
- Heidemann, E., Nerke, O. y Waller, H.D.** (1981). Alkoholtoxische veränderungen de hematopoieses. Eine prospektive studie bei chronischen alkoholikern. *Klin. Wochenschr.* 59:1303-1312.
- Henriksson, J. y Reitman, J.S.** (1976). Quantitative measures of enzymes activities in type I and type II muscle fibers of man after training. *Acta. Physiol. Scand.* 97:392-397.
- Henneman, E. y Olson, C.B.** (1965). Relation between structure and function in the desing of skeletal muscle *J. Neurophysiol.* 28:581-598.
- Hikida, R.S., Staron, R.S., Hagerman, F.C., Sherman, W.M. y Costill, D.L.** (1983). Muscle fiber necrosis associated with human maraton runners. *J. Neurol. Sci.* 59:185-203.

- Hintz, C.S., Coyle, E.F. Kaiser, K.K., Chi, M.M. y Lowry, O.H.** (1984). Comparison of muscle fiber typing by quantitative enzyme assays and by myosin ATPase staining. *J. Histochem. Cytochem.* 32:655-660.
- Ho, F.W., Roy, R.R., Tweedle, C.D., Heusner, W.W., Van Huss, W.D. y Carrow, R.R.** (1980). Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats. *Am. J. Anat.* 157:433-440.
- Holloszy, J.O.** (1967). Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 242:2278-2282.
- Holloszy, J.O.** (1976). Adaptations of muscular tissue to training. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 18:445-458.
- Holloszy, J.O. y Booth, F.W.** (1976). Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 38:273-291.
- Holloszy, J.O. y Coyle, E.F.** (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance and their metabolic consequences. *J. App. Physiol.* 56:831-838.
- Hoppeler, H.** (1987). Training-induced changes in the structure of human skeletal muscle. *Rev. Therap.* 44:844-849.
- Hoppeler, H., Luthi, P., Weibel, E.R. y Howald, H.** (1973). The ultrastructure of normal skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienters. *Pflügers Arch.* 344:217-232.
- Hoppeler, H., Howald, H., Conley, K., Lindsleht, A.E., Claassen, H., Vock, P. y Weibel, E.R.** (1975). Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 59:320-327.
- Hoppeler, H., Mathieu, O., Krauer, R., Claassen, H., Armstrong, B. y Weibel, E.R.** (1981). Desing of the mammalian respiratory system. VI. Distribution of mitochondria and capillaries in various muscles. *Respiration Physiology.* 44:87-111.
- Hoppeler, H., Claassen, H., Howald, H. y Straub, R.** (1983). Correlated histochemistry and morphometry in equine skeletal muscle. *Equine Exerc. Physiol.* (Eds). Snow, D.H., Persson, S.G.B. and R.J. Rose. Granta Editions. Cambridge. 184-192.
- Howald, H.** (1982). Training- induced morphological and functional changes in skeletal muscle. *Int. J. Sports. Med.* 3:1-12.
- Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O. y Straub, R.** (1985). Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Plügers Arch.* 403:369-376.
- Hrelia, S., Lerker, G., Biagi, P.L., Bordoni, A. Stefanini, F., Zunarelli, P. y Rossi, C.A.** (1986). Effect of ethanol intake on human erythrocyte membrane fluidity and lipid composition. *Biochem. International.* 12:741-750.
- Hughes, J.T.** (1974). *Pathology of Muscle.* W. B. Saunders. Philadelphia. 144-149.
- Hultman, E.** (1995). Fibres musculaires. *Proc. Nutrition Soc.* 54:107-121.

- Idström, J.P., Elander, A., Soussi, B., Scherstén. y Bylund-Fellenius, A.C.** (1986). Influence of endurance training on glucose transport and uptake in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 251:H903-H907.
- Ingjer, F.** (1979). Effects of endurance training on muscle fibre ATP-ase activity, capillary supply and mitochondrial content in man. *J. Physiol.* 294:419-432.
- James, N.Y. y Cabric, M.** (1981). Quantitative studies on the numeric of frequency of myonuclei in the muscles of exercised rats: evidence against the occurrence of fibre-splitting. *Br. J. Exp. Pathol.* 62:600-605.
- Jansson, E. y Kaiser, L.** (1977). Muscle adaptation for extreme endurance training in man. *Acta Physiol. Scand.* 100:315-324.
- Jansson, E., Sjodin, B. y Tesch, P.** (1978). Changes in muscle fibre type distribution in man after physical training. A sing of fiber type transformation?. *Acta Physiol. Scand.* 104:235-237.
- Jaweed, M.M., Gordon, E.E., Herbison, G. y Kowalski, K.** (1974). Endurance and strengthening exercise adaptations. In: Protein changes in skeletal muscle. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 55:513-517.
- Johnson, O.** (1974). Influence on the blood ethanol concentration on the acute ethanol-induced liver tryglyceride accumulation in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 2:207-213.
- Jones, D.A., Newham, J.M., Round, J.M. y Tolfree, E.J.** (1986). Experimental human muscle damage: morphological changes in relation to other indices of damage. *J. Physiol. Lond.* 375:435-448.
- Jörnvall, H., Hoog, J.O., Bahr-Lindstrom, H. y Vallee, B.L.** (1987). Mammalian alcohol dehydrogenases of separate classes: intermediates between different enzymes and intraclass isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:2580-2584.
- Juhlin-Dannfelt, A., Ahlborg, G., Hagenfeldt, L., Jorfeldt, L. y Felig, P.** (1977). Influence of ethanol on splanchnic and skeletal muscle substrate turnover during prolonged exercise in man. *Am. J. Physiol.* 233:E195-E202.
- Kahn, L.B. y Meyer, J.S.** (1970). Acute myopathy in chronic alcoholism. A study of 22 autopsy cases with ultrastructural observations. *Am. J. Clin. Pathol.* 53:516-530.
- Kai, M.** (1984). Distribution of fiber types in equine middle gluteal muscle. *Bull. Equine. Res. Inst.* 21:46-50.
- Keiding, S., Christensen, N.J., Damgaard, S.E., Dejgard, A., Iversen, H.L., Jacobsen, A., Johansen, J., Lundquist, F., Rubistein, E. y Winkler, K.** (1983). Ethanol metabolism in heavy drinkers after massive and moderate alcohol intake. *Biochem. Pharmacol.* 22:3097-3102.
- Keppler, D. y Decker, K.** (1974). Glicogen determination with amyloglucosidase. In: *Methods of Enzymatic Analysis.* (Ed). Bergmeyer, H.U. Academic Press. N.Y. 1127-1131.

- Kiessling, K.H., Pilstrom, L. Bylund, A.C., Piehl, K. y Saltin, B.** (1975). Effects of chronic ethanol abuse on structure and enzyme activities of skeletal muscle in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 35:601-607.
- Klausen, K., Andersen, L. y Pelle, I.** (1981). Adaptive changes in work capacity, skeletal muscle capillarization and enzyme levels during training and detraining. *Acta Physiol. Scand.* 113:9-16
- Klinkerfuss, G., Bleisch, V., Dioso, M.M. y Perkoff, G.T.** (1967). A spectrum of myopathy associated with alcoholism: 11 light and electron observations. *Ann. Intern. Med.* 67:493-510.
- Koffler, A., Friedler, R.M. y Massry, S.G.** (1976). Acute renal failure due to non-traumatic rhabdomyolysis. *Ann. Intern. Med.* 85:23-28.
- Komi, P.V., Rusko, H., Vos, J. y Vihko, V.** (1977). Anaerobic performance capacity in athletes. *Acta. Physiol. Scand.* 100:107-114.
- Koop, D.R., Morgan, E.T., Tarr, G.E. y Coon, M.J.** (1982). Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *J. Biol.Chem.* 257:8772-8780.
- Kopun, M. y Propping, P.** (1977). The kinetics of ethanol absorption and elimination in twins and supplementary repetitive experiments in singleton subjects. *Eur. J. Clin. Pharmac.* 11:337-344.
- Kornberg, A.** (1955). Lactic Dehydrogenase of Muscle. *Methods in enzymol.* 1:441-442.
- Kovanen, V., Souminen, H. y Heikkinen, E.** (1980). Connective tissue of "fast" and "slow" skeletal muscle in rats. Effects of endurance training. *Acta. Physiol. Scand.* 108:173-180.
- Kowalski, K., Gordon, E.E., Martinez, A. y Adamek, J.** (1969). Changes in enzyme activities of various muscle fiber types in rat induced by different exercises. *J. Histochem.Cytochem.* 17:601-607.
- Kricka, L.J. y Clark, P.M.S.** (1979). *Biochemistry of alcohol and alcoholism.* Ed. John Wiley & Sons.N.Y. 30-53.
- Kugelberg, E.** (1976). Adaptive transformation of rats soleus units during growth. Histochemistry and contraction speed. *J. Neurol. Sci.* 27:269-289.
- Lafair, J.S. y Myerson, R.M.** (1968). Alcoholic myopathy. *Arch. Intern. Med.* 122:417-422.
- Langohr, H.D., Wiethölter, H. y Peiffer, J.** (1983). Muscle wasting in chronic alcoholics: comparative histochemical and biochemical studies. *J. Neurol. Neurosur. Psychiatry.* 46:248-254.
- Lapieza, M.G., Nuviala, R.J., Roda, L., Azcona, J.M. y Giner, A.** (1988). Perfil enzimático en ciclistas y sus modificaciones con el ejercicio máximo. *Apunts.* 25:191-199.
- Larsson, L. y Edstrom, L.** (1986). Effects of age on enzyme-histochemical fibre spectra and contractile properties of fast- and slow- twitch skeletal muscles in the rat. *J. Neurol. Sci.* 76:69-89.

- Larsson, L., Sjodin, B. y Karlsson, J.** (1978). Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males aged 22-65 years. *Acta Physiol. Scand.* 103:31-39.
- Lasker, J.M., Tsutsumi, M., Bloswick, B.P. y Lieber, C.S.** (1987a). Characterization of benzoflavone (BF)-inducible hamster liver cytochrome P-450-ALC. *Hepatology.* 7:432. (abstract).
- Lasker, J.M., Raucy, J., Kubota, S., Bloswick, B.P., Black, M. y Lieber, C.S.** (1987b). Purification and characterization of human liver cytochrome P-450-ALC. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 148:232-238.
- Laughlin, M.H. y Armstrong, R.B.** (1982). Muscular blood flow distribution patterns as a function of running speed in rats. *Am. J. Physiol.* 243:H296-306.
- Lexel, J.** (1993). Ageing and human muscle: observations from sweden. *Can. J. Appl. Phys.* 18:2-18.
- Li, T.K.** (1977). Enzymology of human alcohol metabolism. *Adv. Enzymol.* 45:283-427.
- Liberson, W.T., Chong, Y.C. y Fried, P.** (1979). EMG studies in alcoholism II. Terminal latencies in the superior gluteal nerve compared to those in distal peroneal and tibial nerves. *Electromyogr. Clin. Neurophysiol.* 19:15-26.
- Lieber, C.S.** (1984). Metabolismo y efectos metabólicos del alcohol. *Clin. Med. Norteamérica.* (Ed). Interamericana-McGraw-Hill.Madrid. 1:3-32.
- Lieber, C.S.** (1992). Ethanol and lipid disorders, including fatty liver hyperlipemia, and atherosclerosis. In *Medical and Nutritional complications of alcoholism.* (Ed). Lieber, C.S. Plenum Medical Book Company. N.Y. 91-126.
- Lieber, C.S. y DeCarli L.M.** (1986). The feeding of ethanol in liquid diets. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 10:550-553.
- Lieber, C.S. y DeCarli L.M.** (1989). Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol-Alcohol.* 24:197-211.
- Lieber, C.S., DeCarli, L.M. y Rubin, E.** (1975). Sequential production of fatty liver, hepatitis and cirrhosis in sub-human primates fed ethanol with adequate diets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:437-441.
- Lieber, C.S., Robinson, S.H. y Glickman, R.** (1978). Pathogenesis and early diagnosis of alcoholic liver injury. *N. Engl. J. Med.* 1:86-90.
- Lieberman, D.A., Maxwell, L.C. y Faulkner, J.A.** (1972). Adaptation of guinea pig diaphragm muscle to aging and endurance training. *Am. J. Physiol.* 222:556-560.
- Lijnen, P., Hespel, P., Fagard, R., Lysens, R., Van Den Eynde, E., Goris, M., Goossens, W., Lissens, W. y Amery, A.** (1988). Indicators of cell breakdown in plasma of men during and after a marathon race. *Int. J. Sports. Med.* 9:108-113.
- Liu, Y.K.** (1973). Leukopenia in alcoholics. *Am. J. Med.* 54:605-613.
- Lowey, S.** (1980). An immunological approach to the isolation of myosin isoenzymes. In: *Plasticity of Muscle.* (Ed). Pette, D. W. De Gruyter. Berlín. 69-81.

- Lowry, C.W., Kimmey, J.S., Felder, S., Chi, M.M.Y., Kaiser, K.K., Passoneav, P.W., Kirk, K.A. y Lowry, O.H.** (1978). Enzyme patterns in single muscle fibers. *J. Biol. Chem.* 253:8269-8277.
- Luchi, P., Cortis, G. y Bucarelli, A.** (1978). Forensic considerations on the comparison of "serum -glutamyltranspeptidase" (" -GT") activity in experimental acute alcoholic intoxication and in alcoholic car drivers who caused road accidents. *Forens. Sci.* 11:33-39.
- Lundquist, F. y Wolthers, H.** (1958). The kinetics of alcohol elimination in man. *Acta. Pharmac. Toxicol.* 1:285-289.
- Lutz, H., Weber, H., Billeter, R. y Jenny, E.** (1979). Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibers of adult rabbits. *Nature.* 281:142-144.
- Macommas, A.J.** (1994). Human neuromuscular adaptations that accompany changes in activity. *Med. Sci. Exports. Exerc.* 26:1498-1509.
- Mackinnon, L.T. y Tomasi, T.B.** (1991). Inmunología del ejercicio. En: *Medicina Deportiva.* (Ed). Appenzeller, O. Doyma. Barcelona. 339-359.
- Mai, J.V., Edgerton, V.R. y Barnard, R.J.** (1970). Capillary of red, white and intermediate muscle fibers in trained and untrained guinea pig. *Experimentia.* 26:1222-1223.
- Martin, F.C. y Peters, T.J.** (1985a). Alcoholic muscle disease. *Alcohol Alcoholism.* 20:125-136.
- Martin, F.C. y Peters, T.J.** (1985b). Assessment in vitro and in vivo of muscle degradation in chronic skeletal muscle myopathy of alcoholism. *Clin. Sci.* 68:693-700.
- Martin, F.C., Slavin, G. y Levi, A.J.** (1982). Alcoholic muscle disease. *Br. Med. Bull.* 38:53-56.
- Martin, F.C., Ward, K., Slavin, G., Levi, A.J. y Peters, T.J.** (1985). Alcoholic skeletal myopathy, a clinical and pathological study. *J. Med.* 218:233-251.
- Martin, N.G., Perl, J., Oakeshott, J.G., Gibson, J.B., Starmer, G.A. y Wilks, A.V.** (1985). A twin study of ethanol metabolism. *Behav. Genet.* 15:93-105.
- Martin, R.P., Haskell, W.L. y Wood, P.D.** (1977). Blood chemistry and lipid profiles of elite distance runners. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 301:346-350.
- Martínez, A.J., Hooshnand, H. y Faris, A.A.** (1973). Acute alcoholic myopathy. Enzyme histochemistry and electron microscopic findings. *J. Neurol. Sci.* 20:245-252.
- Maruyama, S., Murawaki, Y. y Hirayama, C.** (1986). Effects of chronic ethanol administration on hepatic cholesterol and bile acid synthesis in relation to serum high density lipoprotein cholesterol in rats. *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.* 53:3-21.
- Matoba, H. y Gollnick, P.D.** (1984). Influence of ionic composition, buffering agent, and pH on the histochemical demonstration of myofibrillar actomyosin ATPase. *Histochemistry.* 80:609-614.
- Matoba, H., Allen, J.R., Bayly, W.M., Oakley, C.R. y Gollnick, P.D.** (1985). Comparison of fiber types in the skeletal muscle from ten animal species based on the sensibility of the myofibrillar actomyosine ATPase to acid o cooper. *Histochemistry.* 82:175-183.

- Maxwell, L.C., Faulkner, J.A. y Lieberman, D.A.** (1973). Histochemical manifestation of age and endurance training in skeletal muscle fibers. *Am. J. Physiol.* 224:356-361.
- Maxwell, L.C., White, T.P. y Faulkner, J.A.** (1980). Oxidative capacity, blood flow, and capillarity of skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 49:627-633.
- McComas, A.J.** (1994). Human neuromuscular adaptations that accompany changes in activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26:1498-1509.
- McConathy, D., Giddings, C.J. y Gonyea, W.J.** (1983). Structure-function relationships of the flexor carpi radialis muscle compared among four species of mammals. *J. Morphol.* 175:279-292.
- McDonald, J.T. y Margen, S.** (1976). Wine versus ethanol in human nutrition. I. Nitrogen and caloric balance. *Am. J. Clin. Nutr.* 29:1092-1103.
- McMiken, D.F.** (1983). An energetic basis of equine performance. *Equine Vet. J.* 15:123-133.
- McMiken, D.F.** (1986). Muscle-fiber types and horse performance. *Equine. Prac.* 8:6-14.
- Megías, A., Saborido, A.** (1989). Adaptación muscular al ejercicio. *Apunts.* 26- 85-190.
- Melichna, J., Mackva, E.V., Semiginovsky, B., Talar, M., Stichova, J., Slavicek, A., Vankova, S. y Bartuner, Z.** (1987). Effect of exercise on muscle fibre composition and enzyme activities of skeletal muscles in young rats. *Physiol. Bohemoslov.* 36:321-328.
- Mezey, E.** (1985). Metabolic effects of alcohol. *Federation. Proc.* 44:134-138.
- Mills, K.R., Ward, K., Martin, F. y Peters, T.J.** (1986). Peripheral neuropathy and myopathy in chronic alcoholism. *Alcohol Alcoholism.* 21:357:362.
- Mizoi, Y., Tatsuno, Y., Adachi, J., Kogame, M., Fukunagu, T., Fujiwara, S., Hishida, S. y Ijiri, I.** (1983). Alcohol sensitivity related to polymorphism of alcohol-metabolizing enzymes in Japanese. *Pharmac. Biochem. Behav.* 18:127-133.
- Mondon, C.E., Dolkas, C.B., Tobey, T. y Reaven, G.M.** (1984). Causes of the triglyceride-lowering effect of exercise training in rats. *J. Appl. Physiol.* 57:1466-1471.
- Morales, J.L.** (1989). Influencia del entrenamiento sobre la población y morfometría fibrilar de algunos músculos de gran actividad locomotora en la rata. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.
- Morales, J.L. Agüera, E., Vivo J. y Miró, F.** (1990). Modificaciones por el entrenamiento de los tipos de fibras II (IIa y IIb) en músculos de rata. *Arch. Med. Deporte.* 26:127-132.
- Mueller, E.A. y Hettinger, T.** (1953). Ueber unterschiede der training geschwindigkeit atrophierter und normalen muskeln. *Arbeitsphysiol.* 15:223-227.
- Müller, W.** (1974). Temporal progress of muscle adaptation to endurance training in hindlimb muscle of young rats. A. histochemical and morphometrical study. *Cell. Tiss. Res.* 156:61-87.
- Munsat, T.L., Neustein, H., Higgins, T. y Chui, L.A.** (1973). Experimental acute alcoholic myopathy. *Neurology.* 23:407-413.
- Müntener, M.** (1979). Variable pH dependence of the myosin ATPase in different muscles of the rat. *Histochemistry.* 62:299-304.

- Myerson, R.M., Lafair, J.S.** (1970). Alcoholic muscle disease. *Med. Clin. North. Am.* 54:723-730.
- Nebert, D.W., Adesnik, M., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gonzalez, F.J., Guengerich, P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Kemper, B. Levin, W. Phillips, I.R., Sato, R. y Waterman, M.R.** (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA.* 6:1-11.
- Nicholas, M.P., Leon, A.S. y Bloor, C.M.** (1967). Effects of exercise on plasma and tissue levels of lactate dehydrogenase and isoenzymes in rats. *P.S.E.B.M.* 125:999-1002.
- Nishimura, M., Hasumura, Y. y Takeuchi, J.** (1980). Effect of an intravenous infusion of ethanol on serum enzymes and lipids in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterology.* 78:691-695.
- Nuutinen, H. Lindros, K. y Salaspuro, M.** (1983). Determinants of blood acetaldehyde level during ethanol oxidation in chronic alcoholics. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 7:163-168.
- Ogilvie, R.W. y Feedback, D.L.** (1990). A metachromatic dye-ATPase method for the simultaneous identification of skeletal muscle fiber types I, IIA, IIB and IIC. *Stain Technology.* 5:231-241.
- Ohnishi, K. y Lieber, C.S.** (1977a). Reconstitution of the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption. *J. Biol. Chem.* 252:7124-7131.
- Padykula, H.A. y Gauthier, G.F.** (1963). Cytochemical studies of adenosine triphosphatase in skeletal muscle fibers. *J. Cell. Biol.* 18:87-107.
- Padykula, H.A. y Gauthier, G.F.** (1967). Morphological and cytochemical characteristics of fiber types in normal mammalian skeletal muscle. In: *Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy and Related Disorders.* (Ed). Milhorat, A.T. Excerpta Medical Found. Amsterdam. 117-128.
- Padykula, H.A. y Herman, E.** (1955a). Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 3:161-169.
- Padykula, H.A. y Herman, E.** (1955b). The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 3:170-195.
- Papart, A.K., Lorenz, P.B., Papart, E.R., Gregg, J.R. y Chase, A.M.** (1947). The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *J. Clin. Invest.* 26:636-640.
- Peña J.** (1984). Cambios estructurales y ultraestructurales en las células musculares inducidos por el ejercicio. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba.
- Pepe, F.A.** (1983). Immunological techniques in fluorescence and electron microscopy applied to skeletal muscle. In: *Handbook of Physiology. Skeletal Muscle.* (Eds). Peachy, L.D., Adrian, R.H. and S.R Geiger. Williams & Wilkinson. Baltimore 113-141.
- Perkoff, G.T.** (1971). Alcoholic myopathy. *Annu. Rev. Med.* 22:125-132.

- Perkoff, G.T., Dioso, M.M., Bleisch, V. y Klinkerfuss, G.** (1967). A spectrum of myopathy associated with alcoholism. I. Clinical and laboratory features . *Ann Intern. Med.* 67:481-492.
- Peter J.B.** (1971). Histochemical, biochemical and physiological studies of skeletal muscle and its adaptations to exercise. In: *Contractile of muscle cells and related processes*. Symposium of Society of General Physiologists. Prentice-Hall. New Jersey. 151-173.
- Peter J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A. y Stempel, K.E.** (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in Guinea Pigs and Rabbits. *Biochemistry.* 11:2627-2633.
- Peters, T.J., Martin, F. y Ward, K.** (1985). Chronic alcoholic skeletal myopathy-common and reversible. *Alcohol.* 2:485-489.
- Pette, D.** (1980). *Plasticity of muscle*. Ed. W. de Gruyler and Co., Berlin, N.Y.
- Pette, D.** (1984). Activity-induced fast to slow transitions in mammalian muscle. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 16:517-528.
- Pette, D.** (1985). Metabolic heterogeneity of muscle fibres. *J. Exp. Biol.* 115:179-190.
- Pette, D. y Spamer, C.** (1986). Metabolic properties of muscle fibers. *Federation Proc.* 45:2910-2915.
- Pierobon-Bormioli, S., Libera, L.D., Vitadello, M. y Schiaffino, F.** (1981). "Fast" isomyosins and fiber types in mammalian skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 29:1179-1188.
- Pietruszko, R.** (1983). Aldehyde dehydrogenase isozymes. In: *Isozymes: current topics in biological and medical research*. Vol 8. Cellular localization, metabolism, and physiology. (Eds). Rattazzi MC., Scandalios JG. and G.S. Whitt. Liss. N.Y. 195-217.
- Pittman, J.F. y Decker, J.P.** (1971). Acute and chronic myopathy associated with alcoholism. *Neurology.* 21:293-296.
- Poggi, P., Marchetti, C. y Scelsi, R.** (1987). Automatic morphometric analysis of skeletal muscle fibers in the again man. *Anat. Rec.* 217:30-37.
- Pösö, A.R.** (1987). Ethanol and hepatic protein turnover. *Alcohol Alcohol.* 1:83-90.
- Preedy, V.R. y Peters, T.J.** (1987). The young rat as a model for alcohol-induced skeletal muscle myopathy. *Biochem. Soc. Transact.* 15:1166-1167.
- Preedy, V.R. y Peters, T.J.** (1988). Acute effects of ethanol on protein syntesis in different muscles and muscle protein fractions of the rats. *Clin. Sci.* 74:461-466.
- Preedy, V.R., Duane, P. y Peters, T.J.** (1988). Comparison of the acute effects of ethanol on liver and skeletal muscle protein synthesis in the rat. *Alcohol & Alcoholism.* 23:155-162.
- Preedy, V.R., Keating, J.W. y Peters, T.J.** (1992). The acute effects of ethanol and acetaldehyde on rates of protein synthesis in type I and type II fibre-rich skeletal muscles of the rat. *Alcohol & Alcoholism.* 27:241-251.
- Prince, F.P., Hikida, R.S. y Hagerman, F.C.** (1977). Muscle fiber type in women athletes and non athletes. *Pflügers Arch.* 371:161-165.

- Prince, F.P., Hikida, R.S., Hagerman, F.C. y Staron, R.S.** (1981). A morphometric analysis of human muscle fibers with relation to fiber types and adaptation to exercise. *J. Neurol. Sci.* 49:165-179.
- Ranvier, L.** (1873). Propriétés et structures différents des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *CR. Acad. Sci. Paris.* 77:1030-1043.
- Redondo, P.A., Alvarez, A.I., Díez, C. Fernández, F. y Prieto, J.G.** (1995). Physiological response to experimentally induced anemia in rats: a comparative study. *Lab. Anim. Sci.* 45:578-583.
- Reichmann, H. y Pette, D.** (1982). A comparative microphotometric study of succinate dehydrogenase activity levels in type I, IIA and IIB fibres of mammalian and human muscles. *Histochemistry.* 74:27-41.
- Reitsma, W.** (1970). Some structural changes in skeletal muscles of the rat after intensive training. *Acta. Morphol. Neerl. Scand.* 7:229-246.
- Riley, V.** (1960). Adaptation of orbital bleeding technics to rapid serial blood studies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104: 751-755.
- Ripoll, E., Sillav, A.H. y Banchemo, N.** (1979). Changes in the capillarity of skeletal muscle in the growing rat. *Pflügers Arch.* 380:153-158.
- Risco, C.** (1988). Adaptación del músculo esquelético al ejercicio: adaptaciones morfológicas y cambios en proteínas contráctiles. *Apunts.* 25:105-111.
- Rivero, J.L.L., Serrano, A.L., Henckel, P. y Agüera, E.** (1993). Muscle fiber type composition and fiber size in successfully and unsuccessfully endurance-raced horses. *J. Appl. Physiol.* 75:1758-1766.
- Roberts, A.D., Billeter, R. y Howald, H.** (1982). Anaerobic muscle enzyme changes after interval training. *Int. J. Sports. Med.* 3:18-21.
- Rodríguez-Barbudo, M.V., Moreno, F., Fuentes, S., Vivo, J., Monterde, J.G., Miró, F., Carpio, M. y Gil, F.** (1983). Distribución estratigráfica de las fibras de los musculos de actividad funcional antagonica del perro mediante técnicas de ATPasa. *Morf. Norm. Patol.* 7:1089-1094.
- Romanul, F.C.A.** (1964). Enzyme in muscle: I histochemical studies of enzymes in individual muscle fibres. *Arch. Neurol.* 11:355-368.
- Romanul, F.C.A.** (1965). Capillary supply and metabolism of muscle fibres. *Arch. Neurol.* 12:497-509.
- Rose, R.J.** (1986). Endurance exercise in the horse: a review. *Brit. Vet. J.* 142:532-552.
- Rothschild, M.A., Oratz, M. y Schreiber, S.S.** (1985). Alcohol effects on albumin synthesis. In: *Genetics and alcoholism* (Eds). Goelde, H.W. and D.P Agarwal. Liss. N.Y. 33-44.
- Rowe, R.W. y Goldspink, G.** (1969). Muscle fibre growth in five different muscles in both sexes of mice. I. Normal mice. *J. Anat.* 104:531-533.
- Ryan, D.E., Koop, D.R., Thomas, P.E., Coon, M.J. y Levin, W.** (1986). Evidence that isoniazid and ethanol induce the same microsomal cytochrome P-450 isozyme 3^a. *Arch. Biochem. Biophys.* 246:633-644.

- Salaspuro M. y Lieber, C.S.** (1978). Non-uniformity of blood ethanol elimination: its exaggeration after chronic consumption. *Ann. Clin. Res.* 10:294-297.
- Salmons, S.** (1980). The response of skeletal muscle to different patterns of use. Some new development and concepts. In: *Plasticity of muscle*. (Ed). Pette, D. W. de Gruyler. Berlin, N.Y. 387-399.
- Salmons, S. y Henriksson, J.** (1981). The adaptative response of skeletal muscle to increased use. *Muscle & Nerve*. 4:94-105.
- Saltin, B. y Gollnick, P.D.** (1983). Skeletal muscle adaptability: significance for the metabolism and performance. In: *Handbook of Physiology*. Section 10. (Eds). Peachey, L.D., Adrian, R. and J.R. Geiger. Williams & Wilkinson Co. Baltimore. 555-631.
- Saltin, B., Nazar, K., Costill, D.L., Stein, E., Jansson, E. y Essen, B.** (1976). The nature of the training response: peropheral and central adaptations to onelegged exercise. *Acta Physiol. Scand.* 96:289-305.
- Saltin, B., Henriksson, J., Nygaard, E. y Andersen, P.** (1977). Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary men and endurance runners. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 301:3-29.
- Saltin, B., Kiens, B., Savarg, G. y Preben, K.** (1986). Role of haemoglobin and capillarization for oxygen delivery and extraction in muscular exercise. *Acta. Physiol. Scand.* (128. Suppl). 556:21-32.
- Saubert IV, C.W., Armstrong, R.E., Shepherd, R.E. y Gollnick, P.D.** (1973). Anaerobic enzyme adaptations to sprint training in rats. *Pflügers Arch.* 341:305-312.
- Schantz, P., Billeter, R., Henriksson, J., Jansson, E.** (1982). Training-induced increase in myofibrillar ATPase intermediate fibers in human skeletal muscle. *Muscle & Nerve*. 5:628-636.
- Schiaffino, S., Ansoni, S., Gorza, L., Saggin, L. Gunderson, K. y Lomo, T.** (1988). Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. *Acta Physiol. Scand.* 134:575-576.
- Schwane, J.A. y Armstrong, R.B.** (1983). Effects of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats. *J. Appl. Physiol.* 55:969-975.
- Seitz, H.K., Garro, A.J. y Lieber, C.S.** (1978). Effect of chronic ethanol ingestion on intestinal metabolism and mutagenicity of benzo(a)pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:1061-1066.
- Seligman, A.M. y Rutenburg, A.M.** (1951). The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. *Science.* 113:317-321.
- Shelmet, J.J., Reichard, G.A., Skutches, C.L., Hoeldtke, R.D., Owen, O.E. y Boden, G.** (1988). Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat and protein oxidation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 81:1137-1145.
- Shapiro, Y., Magazanic, A., Sohar, E. y Reich, C.B.** (1972). Serum enzyme changes in untrained subjects following a prolonged march. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 51:271-375.

- Shaw, S. y Lieber, C.S.** (1980). Mechanism of increased gamma glutamyl transpeptidase after chronic alcohol consumption. Hepatic microsomal induction rather than dietary imbalance. *Subs. Alcohol Actions Misuse*. 1:423-428.
- Shorey, C.D. y Cleland, K.W.** (1983). Problems associated with the morphometric measurement of transverse skeletal muscle fibers: I. Analysis of frozen sections. *Anat. Rec.* 207:523-531.
- Siamak, A., Baraona, E. y Lieber, C.S.** (1992). Effects of ethanol on amino acid and protein metabolism. In: *Medical and Nutritional complications of alcoholism*. (Ed). Lieber, C.S. Plenum Medical Book Company. N.Y. 127-163.
- Siest, G. y Galteau, M.M.** (1974). Variations of plasmatic enzymes during exercise. *Enzyme*. 17:179-195.
- Simon, T.L.** (1991). Hematología del deporte. En: *Medicina Deportiva*. (Ed). Appenzeller, O. Ed. Doyma. Barcelona. 319-338.
- Slavin, G., Martin, F., Ward, P., Levi, J. y Peters, T.J.** (1983). Chronic alcohol excess is associated with selective but reversible injury to type IIb muscle fibres. *J. Clin. Pathol.* 36:772-777.
- Snow, D.H.** (1983). Skeletal muscle adaptations: a review. In: *Equine exercise physiology*. (Eds). Snow, D.H., Persson, S.G.B. and R.J. Rose. Granta Editions, Cambridge, 160-183.
- Snow, D.H. y Guy, P.S.** (1980). Muscle fibre type composition of a number of limb muscles in different types of horse. *Res. Vet. Sci.* 28:137-144.
- Soler Insa, P.A., Freixa, F. y Reina Galan, F.** (1988). *Trastorno por dependencia del alcohol. Conceptos actuales*. Laboratorios Delagrangé. Madrid. 113-114.
- Soukup, T., Vydra, J. y Cerny, M.** (1979). Changes in ATPase and SDH reactions of rat extrafusal and intrafusal muscle fibres after preincubation at different pH. *Histochemistry*. 60:71-84.
- Spamer, C. y Pette, D.** (1980). Metabolic subpopulations of rat skeletal muscle fibres. In: *Plasticity of Muscle*. (Ed). Pette, D. W. de Gruyter. Berlin. 19-30.
- Spargo, E.** (1981). Alcohol and muscle disease. *Br. J. Alcohol Alcoholism*. 16:124-134.
- Spector, R., Choudhury, A., Cancilla, P. y Lakin, R.** (1979). Alcoholic myopathy diagnosis by alcohol challenge. *J.A.M.A.* 242:1648-1649.
- Spodaryk, K., Dabrowski, Z., Miszta, H. y Szygula, Z.** (1986). Activity of reticulocyte and erythrocyte acetylcholinesterase of rats in normal and experimental conditions. *Folia Biol.* 34:313-317.
- Spolarics, Z., Bagby, G.J., Pekala, P.H., Dobrescu, C., Skrepnik, N. y Spitzer J.J.** (1994). Acute alcohol administration attenuates insulin-mediated glucose use by skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 267:E886-E891.
- Srere, P.A., Brazil, A. y Boneu, L.** (1963). The Citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand.* 17-19.

- Staron, R.S. y Pette, D.** (1986). Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry*. 86:19-25.
- Stein, J.M. y Padykula, H.A.** (1962). Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *Am. J. Anat.* 110:103-123.
- Stull, C.** (1986). Muscles for motion. *Equine practice*. 8:17-20.
- Sullivan, T. y Armstrong, R.** (1978). Rat locomotory muscle fibre activity during trotting and galloping. *J. Appl. Physiol.* 44:258-363.
- Sumida, K.D. y Donovan, C.M.** (1995). Enhanced hepatic gluconeogenic capacity for selected precursors after endurance training. *J. Appl. Physiol.* 79:1883-1888.
- Szentkuti, V.L. y Cassens, R.J.** (1978). Die verteilung der fasertypen I, IIA and IIB im M. longissimus dorsi und M. semitendinosus von schweinen verschieden alters. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 85:1-40.
- Szentkuti, V.L. y Schlegel, O.** (1985). Genetical and functional influences on fiber type composition and fiber diameter in M. Longissimus dorsi and M. Semitendinosus of pigs. Studies on exercised domestic pigs and wild pigs kept under restricted mobility. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 92:93-97.
- Szentkuti, V.L., Niemeyer, B. y Schlegel, O.** (1981). Comparative study on types of muscle fiber M. longissimus dorsi of domestic and wild pig using the miosin-ATPase reaction. *Dtsch Tierärztl. Wschr.* 88:407-411.
- Tamaki, N.** (1983). Diaphragm muscle fiber composition, capillarity and maximal oxygen uptake in male and female rats. *Sport Sci. Med.* 12:33-39.
- Tamaki, N.** (1985). Effect of growth on muscle capillarity and fiber composition in rat diaphragm. *Eur. J. Appl. Physiol.* 54:24-29.
- Tauchi, H., Yashioka, H. y Kobayashi, H.** (1971). Age change of skeletal muscles of the rat. *Gerontology*. 17:219-222.
- Tesch, P.A. y Karlsson, J.** (1985). Muscle fiber types and size in trained and untrained muscle of the elite athletes. *J. Appl. Physiol.* 59:1716-1720.
- Trounce, I., Byrne, E. y Dennett, X.** (1990). Biochemical and morphological studies of skeletal muscle in experimental chronic alcoholic myopathy. *Acta. Neurol. Scand.* 82:386-391.
- Troup, J.P., Metzger, J.M. y Fitts, R.H.** (1986). Effect of high-intensity exercise training on functional capacity of limb skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 60:1743-1751.
- Tunell, G.L. y Hart, M.N.** (1977). Simultaneous determination of skeletal muscle fiber types I, IIA, and IIB by histochemistry. *Arch. Neurol.* 34:171-173.
- Valaitis, J., Pilz, C.G., Oliver, H. y Chomet, B.** (1960). Myoglobinuria, myoglobinuric nephrosis and alcoholism. *Arch. Pathol.* 70:195-202.
- Van den Hoven, R. Meijer, A.E.F.H., Wensing, T. y Breuking, D.M.V.** (1985). Enzyme histochemical features of equine gluteus muscle fibers. *Am. J. Vet. Res.* 46:1755-1761.
- Van Der Meulen, J.H., Kuipers, H. y Drukker, J.** (1991). Relationship between exercise-induced muscle damage and enzyme release in rats. *J. Appl. Physiol.* 71:999-1004.

- Velez-García, E., Hardy, P., Dioso, M. y Perkoff, G.T.** (1966). Cysteine-stimulated serum creatine phosphokinase: unexpected results. *J. Lab. Clin. Med.* 68:636-645.
- Viitasalo, J.T. y Komi, P.V.** (1978). Force time characteristics and fibre composition in human extensor muscles. *Eur. J. App. Occupational Physiol.* 40:7-15.
- Walker, M.G.** (1966). The effect of exercise on skeletal muscle fibres. *Comp. Biochem. Physiol.* 19A:791-797.
- Walmsley, B., Hodgson, J.A. y Burke, R.E.** (1978). Forced produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J. Neurophysiol.* 41:1202-1216.
- Walton, J.** (1981). *Disorders of voluntary muscle*. Churchill Livingstone,. Edinburgh and London.
- Ward, R.J. y Preedy, V.R.** (1992). Imidazole dipeptides in experimental alcohol-induced myopathy. *Alcohol Alcoholism.* 27:633-639.
- Watt, P.W., Kelly, F.J., Goldspink, D.F. y Goldspink, G.** (1982). Exercise-induced morphological and biochemical changes in skeletal muscles of the rat. *J. Appl. Physiol.* 53:1144-1151.
- Welling, P.G., Lyons, L.L., Elliot, R. y Amidon, G.L.** (1977). Pharmacokinetics of alcohol following single low doses to fasted non-fasted subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 17:199-206.
- Wilkinson, P.K.** (1980). Pharmacokinetic of ethanol: A review. *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 4:6-21.
- Wilmore, J.H. y Costill, D.L.** (1994). *Physiology of sport and exercise*. 35.
- Wilson, F.A. y Hoyumpa, A.M.** (1979). Ethanol and small intestinal transport. *Gastroenterology.* 76:388-403.
- Worden, R.E.** (1976). Pattern of muscle and nerve pathology in alcoholism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 273:351-359.
- Wu, A., Chanarin, I., Slavin, G. y Levi, A.J.** (1975). Folate deficiency in the alcoholic- its relationship to clinical and haematological abnormalities, liver disease and folate stores. *Br. J. Haematol.* 29:469-478.
- Yeh, J.I., Gulve, E.A., Rameh, L. y Birnbaum, M.J.** (1995). The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin and contraction activated hexose transport. *J. Biol. Chem.* 270:2107-2111.
- Yellin, H. y Guth, L.** (1970). The histochemical classification of muscle fibers. *Exp. Neurol.* 26:424-432.
- Youn, J.H., Gulve, E.A., Holloszy, J.O.** (1991). Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction. *Am. J. Physiol.* 260:C555-C561.