

DOLOR MUSCULAR TARDÍO. UN ANÁLISIS DE LOS PROCESOS AUTOGÉNICO, FAGOCÍTICO Y REGENERATIVO DE LA LESIÓN

DELAYED ONSET MUSCLE SORENESS. AN ANALYSIS OF AUTOGENIC, PHAGOCYTE AND REGENERATIVE PROCESS OF LESION

Como vimos en el artículo anterior, durante el ejercicio intenso o desacostumbrado, existe un fallo inicial en algunos componentes estructurales de la fibra muscular, provocado por mecanismos físicos o metabólicos. En este momento, abordaremos las distintas fases que ocurren tras el proceso inicial que genera la lesión muscular.

1 – LA FASE AUTOGÉNICA

La rotura de los componentes celulares provoca la pérdida de la homeostasis del Ca^{++} en la célula, sea alterando la permeabilidad de la barrera del Ca^{++} extracelular, lo que permite al Ca^{++} entrar en la célula por el sitio dañado de la membrana, alterando los sistemas amortiguadores del mismo en la fibra, o comprometiendo la liberación y remoción del propio Ca^{++} celular. Una vez el Ca^{++} libre en el citosol, las concentraciones llegan a niveles críticos y varios mecanismos degenerativos activados por Ca^{++} inician su actuación en las fibras musculares lesionadas. A continuación, serán comentadas algunas vías autogénicas o intrínsecas de degradación de la fibra muscular que generalmente son activadas por el aumento del Ca^{++} citosólico.

1.1 - Proteasas neutras activadas por Ca^{++}

Las proteasas neutras dependiente de Ca^{++} , referidas como calpains por Murachi y col⁽⁴⁰⁾, son identificadas como del tipo 1 o tipo 2, dependiendo del nivel de Ca^{++} requerido para su activación⁽⁵⁰⁾.

La isoforma del tipo 1 es activada en presencia de cantidades micromolares de Ca^{++} , y la isoforma del tipo 2 es activada por la presencia de cantidades

milimolares⁽⁴⁰⁾. Esas enzimas actúan a pH neutro y no son específicas para ninguna proteína o secuencia peptídica⁽³⁹⁾. Su activación está asociada con la degradación de estructuras particulares en la célula muscular y eso sugiere que las enzimas están localizadas en las fibras. Por ejemplo, las proteasas activadas por Ca^{++} , pueden específicamente degradar los discos-Z^(10, 14, 17, 31, 59) o los componentes de los filamentos contráctiles^(14, 17, 18). Las proteasas activadas por Ca^{++} asociadas a estas estructuras podrían explicar la separación de las líneas Z^(23, 24, 46) o la ruptura de la banda A^(24, 43, 46) que ocurre en las fibras musculares lesionadas por contracción excéntrica. La calpaina, localizada en las regiones "I" y "Z" del músculo esquelético⁽⁶⁾, degrada los discos Z por digestión de las proteínas zeelina 1 y zeelina 2, las cuales sirven para fijar la α -actinina en el disco, liberándose así la α -actinina y por lo tanto contribuyendo a la desorganización del sarcómero⁽⁹⁾.

Con bajos niveles de Ca^{++} , la actividad de la calpaina aumenta en la presencia de fosfolípidos^(9, 33). También existen evidencias de que las proteínas del citoesqueleto son particularmente buenos sustratos para las proteasas activadas por Ca^{++} ⁽⁴⁸⁾. Así, se ha propuesto que la proteólisis de vinculina, una proteína citoesquelética que fija la membrana al citoesqueleto, realizada por proteasas activadas por Ca^{++} , provoca un aumento en la fragilidad del sarcolema en las células miocárdicas durante un proceso isquémico⁽⁵⁸⁾.

Las rupturas en el citoesqueleto y en el sarcolema de la fibra muscular parecen ser circunstancias inherentes al DMT causado por contracción excéntrica. Lieber y col⁽³⁴⁾, encontraron una pérdida significativa de desmina en el músculo, quince minutos tras una

Cabral de Oliveira, A.C.*

Pérez, A. C.**

* Universidad de León, Universidad Federal de Sergipe, Becario CAPES - BRASIL

** Doctora en Fisiología, Becaria de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología de España en el Depto de Fisiología, Universidad de León.

CORRESPONDENCIA:

Antonio Cesar Cabral de Oliveira. Rua Anamias Azevêdo 754. 49020080 Aracaju. Sergipe. Brasil.

Aceptado:
06.06.01

exposición a un ejercicio excéntrico. Belcastro y col⁽⁵⁾, señalaron una concomitante pérdida en la estructura del disco-Z provocada por una pérdida de la desmina y α -actina, y también, encontraron un aumento de la actividad de la calpaína después de un exhaustivo ejercicio⁽⁷⁾. El hecho de que la actina y la miosina no son sustratos de la calpaína, puede explicar porque el daño ultraestructural es predominantemente encontrado en el disco-Z, estando la actina y la miosina relativamente intacta⁽¹²⁾.

Las células también contienen un inhibidor de proteasas dependiente de Ca^{++} llamado calpastatina, que inhibe efectivamente ambos tipos de proteasas neutras activadas por Ca^{++} ^(19,38,40). Aunque las proteínas supuestamente sean citosólicas, hay evidencias de que están asociadas con el sarcolema y posiblemente con el SR en las células del corazón⁽³⁹⁾. Ha sido sugerido que la función básica de la calpastatina es impedir la proteólisis de proteínas de membrana durante breves exposiciones al Ca^{++} ⁽³⁹⁾.

1.2 - Proteasas Lisosomales

Otro mecanismo autogénico a tener en cuenta, es que las proteínas miofibrilares pueden ser degradadas por enzimas proteolíticas contenidas en los lisosomas de las fibras musculares^(37,56). Es razonable hipotetizar que esas proteasas pueden jugar un papel importante en la fase autogénica de la lesión muscular inducida por ejercicio. Después de una carrera exhaustiva en tapiz rodante con ratas, se puede encontrar grandes aumentos de las actividades lisosomales en los músculos⁽⁶¹⁾ a partir del segundo día post-ejercicio. Los autores concluyen que existe una elevada actividad proteasa ligada a la propia fibra muscular, aunque la infiltración celular provocada por el ejercicio exhaustivo, también es responsable de parte de estos aumentos. No obstante, no hay evidencias de que las proteasas lisosomales intrínsecas, sean liberadas o activadas durante o inmediatamente después del ejercicio que lesiona los músculos esqueléticos.

En algunos tejidos, ha sido demostrado que la calmodulina está asociada con los lisosomas, indicando que el Ca^{++} puede servir para activar las proteasas⁽⁴⁴⁾. También, hay evidencias de que las enzimas lisosomales son activadas cuando los músculos son expuestos al Ca^{++} ionoforizado⁽⁵²⁾. Esos

autores interpretaron sus datos alegando que los elevados niveles de Ca^{++} intracelular activan la fosfolipasa A2, la cual aumenta la producción de prostaglandina. En particular, la prostaglandina E2 producida por la activación de la fosfolipasa A2, parece estimular la actividad de la proteasa lisosomal.

En conclusión, las fibras musculares contienen mecanismos dependientes de Ca^{++} que estimulan las proteasas lisosomales. Esas vías pueden representar un papel en la fase autogénica de la lesión de la fibra muscular inducida por ejercicio, aunque los resultados de otros estudios no confirmen este papel importante.

Alteraciones en la concentración celular del Ca^{++} , también se puede asociar al fenómeno de la contractura, es decir, una contracción involuntaria de los sarcomeros⁽²⁾. La pérdida de la homeostasis del Ca^{++} en la fibra muscular puede resultar en una contracción incontrolada de los sarcomeros en el área afectada. Ese fenómeno ha sido observado en músculos de ratas que realizaron ejercicio excéntrico de marcha⁽⁴⁶⁾ y presentaron inmediatamente después del ejercicio, partes de algunas miofibrillas del músculo lesionado hipercontraídas. Si la rápida elevación de los niveles de Ca^{++} intracelular ocurre en los sarcomeros que tienen suficiente ATP para soportar la contracción, es razonable esperar que estos sarcomeros desarrollasen una contractura. Esta banda de hipercontractura, puede servir para aislar como una pared la lesión, y proteger los sarcomeros adyacentes de los procesos degenerativos⁽¹¹⁾.

Una descontrolada contracción de la fibra muscular tendrá varias consecuencias. En primer lugar, la fibra puede ser un lugar de depleción de fosfatos de alta energía como consecuencia de las continuas contracciones. Esa reducida concentración de ATP podría contribuir como un "feedback" positivo en el cual las reservas de energía decrecen con el aumento de los niveles de Ca^{++} intracelular.

Es comúnmente aceptado que la mayor función del dolor es la de proteger el organismo de algunos efectos nocivos en los tejidos. Sin embargo, el DMT no parece cumplir esta aseveración, puesto que, como el estado doloroso surge solamente después del ejercicio, presumiblemente no tiene una función de proteger ante un excesivo trabajo durante la actividad

que provoca el daño. Podemos argüir que el DMT desactiva o desestima el uso del músculo por el tiempo que requiera descanso, aunque se sepa que ejercitando un músculo dolorido, parece proporcionar el camino más eficiente para reducir el estado dolorido. También, en el tiempo en que el músculo desarrolla el máximo estado dolorido después de un esfuerzo (24-72 horas), recobra la capacidad para producir fuerza⁽⁴³⁾, con lo que la función benéfica del dolor muscular tardío no está clara.

Concluyendo, hemos de resaltar que si la depleción del ATP, por una elevada actividad del Ca^{++} -ATPasa, precede a la pérdida de la homeostasis del Ca^{++} , la contractura de los sarcomeros afectados presumiblemente es mínima. Como hemos resaltado anteriormente, la secuencia de los procesos aun no es conocida completamente, y ambas, la elevación del Ca^{++} intracelular y el decrecimiento de la concentración de ATP ocurren como parte de un ciclo vicioso asociado con los procesos de lesión.

Según lo expuesto, la posible secuencia de eventos en la producción del DMT puede ser propuesta empezando con la suposición de que la elevada tensión en el músculo motiva el daño estructural. A continuación, describimos un modelo propuesto por Armstrong⁽³⁾, que de manera sucinta, puede mejor explicar el fenómeno DMT.

1 – La existencia de grandes tensiones producidas durante el ejercicio muscular, particularmente en el ejercicio excéntrico, donde las fuerzas se distribuyen relativamente sobre pequeñas áreas de corte transversal del músculo, causa la rotura de proteínas estructurales de las fibras musculares y en el tejido conectivo.

2 – El daño estructural del sarcolema, o alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular, resultante de las elevadas fuerzas mecánicas son acompañadas de una entrada de Ca^{++} desde el intersticio, lo que provoca varios efectos deletéreos en la fibra muscular^(14, 62). Si existe un elevado nivel de Ca^{++} en la célula, las mitocondrias acumulan el ion, inhibiendo así la respiración celular^(13, 62, 63), eso inicia una secuencia de acontecimientos que disminuye la capacidad para producir ATP, lo que compromete la capacidad de la célula para transportar activamente el Ca^{++} . Una elevada concentración de Ca^{++} en la célula

muscular ha sido demostrado que activa las enzimas proteolíticas dependiente de calcio, que preferencialmente degradan los discos-Z^(14, 18, 31), la troponina y la tropomiosina^(17, 18).

3 – El progresivo deterioro del sarcolema en el periodo postejercicio, puede ser acompañado de una salida de componentes intracelulares hacia el espacio extracelular y el plasma. Esas sustancias, así como los productos de la ruptura del colágeno⁽⁴⁹⁾, pueden servir para atraer monocitos^(3, 55) que se convierten a macrófagos para activar las células cebadas e histocitos en las áreas lesionadas. Acompañando ese proceso pueden ser activadas proteasas lisosomales endógenas⁽⁵³⁾, que degradan otras especies de proteínas musculares.

4 – La acumulación de sustancias en el intersticio de las regiones de las terminaciones nerviosas libres del tipo IV, resultante de la activación fagocítica y necrosis celular, así como elevadas presiones del tejido edematoso y el aumento de la temperatura local, pueden entonces activar los nociceptores y provocar la sensación de dolor.

2 – LAS FASES FAGOCÍTICAS Y REGENERATIVAS

El daño en la fibra muscular resulta en un proceso inflamatorio, con una respuesta inespecífica tisular de intensidad proporcional y adecuada a la intensidad del estímulo agresor. Tras esta fase destructiva o de inflamación propiamente dicha, tanto del agente como del tejido objeto de la agresión, tiene lugar otra de índole reparativa que tiende a la reconstrucción tisular.

El paso previo fundamental para que las células puedan acceder al foco inflamatorio es la vasodilatación arteriolar, con la consiguiente hiperemia tisular e incremento de la permeabilidad vascular. A continuación, tiene lugar la marginalización y adherencia de los leucocitos a las paredes del vaso, paso necesario para su posterior salida y actuación en el tejido afectado. Específicos agentes químicos dirigen la inmigración de leucocitos a través de las paredes del endotelio hacia el área lesionada⁽¹⁾. Eso provoca una transferencia de fluidos para el tejido lesionado, formándose el exudado inflamatorio y originando las

clásicas manifestaciones locales de la inflamación, es decir: hinchazón o tumor, rubor, calor, dolor y alteración funcional.

El incremento en el número de células inflamatorias que aparecen en el músculo lesionado, puede ser resultado de una información química enviada a las células inflamatorias circulantes que invaden el lugar lesionado, o de una mitogénesis de células inflamatorias que normalmente residen en el músculo⁽⁶⁰⁾. Aunque el origen de las células inflamatorias en el músculo no tenga sido extensamente investigada, hay evidencias de que una información de naturaleza química oriunda de las células dañadas, es probablemente el mecanismo primario responsable pelo aumento de la concentración de células inflamatorias en el músculo lesionado.

El mecanismo que desencadena este estímulo químico atractivo en el músculo dañado aun no es conocido, sin embargo, varias teorías son citadas en la literatura.

La lesión muscular inducida por ejercicio, generalmente libera al espacio extracelular, proteínas citosólicas musculares y este hecho puede, teóricamente, ser el estímulo químico atractivo de las células inflamatorias⁽⁶⁰⁾.

Los fibroblastos son también candidatos a mediadores de quimiotaxis de células inflamatorias al músculo lesionado, ya que están presentes en el tejido conectivo cercano y la lesión puede estimular a ellos a hacerse activos en la síntesis proteica. Adicionalmente, los fibroblastos son capaces de degradar moléculas de la matriz extracelular en el local dañado, produciendo fragmentos proteolíticos que son quimioatrayentes para fibroblastos⁽²⁵⁾ y células inflamatorias⁽⁴⁹⁾ y pueden estimular la actividad fagocítica⁽¹⁵⁾.

Los macrófagos residentes en el músculo sano, son también mediadores potenciales entre el músculo lesionado y la inflamación. Aunque estudios previos tengan mostrado que los macrófagos residentes no son la fuente primaria de estimulación de las células inflamatorias en el músculo dañado⁽⁴⁾, su localización cercana a la superficie de las fibras musculares, los permite actuar como sensores de lesión.

Un mecanismo adicional que puede ser la razón fundamental de la inflamación muscular tras una lesión, es la activación del Sistema de Complemento. La relación del Sistema de Complemento en la inflamación muscular, viene siendo bien establecida cuando se estudia las dolencias musculares como distrofias y miopatías.

Como una consecuencia de la respuesta inflamatoria, ocurre un hinchazón en el músculo ejercitado excéntricamente⁽¹²⁾. Los productos de la ruptura muscular, como por ejemplo, fragmentos de proteínas, son lentamente removidos de la matriz extracelular vía el sistema linfático lo que puede atraer agua, formando un edema localizado. El máximo del edema puede no ocurrir hasta los cinco a diez días postejercicio⁽¹²⁾. El hinchazón empieza dentro del músculo y entonces se extiende hacia el espacio subcutáneo empezando alrededor del quinto día postejercicio. Nokasa y Clarkson⁽⁴⁵⁾, observaron que el fluido acumulado seguía moviéndose hacia fuera del perimio, tras diez días postejercicio.

Se especula que los neutrófilos parecen ser las primeras células que infiltran en las fibras musculares dañadas⁽¹²⁾. En un estudio sobre la invasión de células mononucleadas en el músculo tras una contracción excéntrica⁽²¹⁾, quedó evidente un rápido incremento en la población de neutrófilos postejercicio, permaneciendo esta elevación por varios días después del esfuerzo.

Muchos trabajos tienen presentado los macrófagos residentes en el tejido, como el tipo de célula inflamatoria predominante en la inflamación durante las primeras doce horas postejercicio⁽⁴⁷⁾, siendo los responsables pela respuesta temprana a la inflamación, seguido de una emigración de neutrófilos que proveen las señales quimiotáxicas adicionales para que migren del sistema circulatorio las células inflamatorias hacia el músculo lesionado⁽⁶⁰⁾.

Belcastro y col⁽⁶⁾, sugieren que fragmentos peptídicos de calpaína pueden estar relacionados con los neutrófilos, y Raj y col⁽⁵¹⁾, encontraron una relación entre proteasas de cisteína estimuladas por calcio y la acumulación de neutrófilos y también sugieren que la calpaína participa en la activación de la invasión de los neutrófilos. Aunque el aumento tanto de la circulación de neutrófilos, como de la acumulación de

neutrófilos en el tejido muscular esquelético, ha sido encontrado en humanos tras un ejercicio excéntrico, el papel de los neutrófilos en el proceso del daño y de la reparación, aún no está totalmente esclarecido ⁽³⁶⁾.

Tanto los macrófagos como los neutrófilos, son capaces de producir radicales libres de oxígeno y enzimas citotóxicas que actúan en la degradación de los tejidos. La xantina oxidasa por ser capaz de captar electrón del oxígeno molecular, genera especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden causar daño muscular ⁽²⁷⁾. Los mismos autores, ⁽²⁶⁾ encontraron un aumento de la expresión de la xantina oxidasa en las células endoteliales microvasculares y una invasión de leucocitos, cuatro días postejercicio. Ellos sugirieron que un proceso inflamatorio secundario que induce la xantina oxidasa, puede contribuir para la generación de radicales libres en los días inmediatamente tras el ejercicio excéntrico, lo que agrava el daño existente. Eso puede explicar el aumento del daño ultraestructural que es observado en los días posteriores a la realización del ejercicio excéntrico.

Los procesos de isquemia-perfusión pueden también provocar la aparición de radicales libres y daños en el endotelio capilar. Howell y col ⁽³⁰⁾, demostraron que el flujo de la sangre aumenta drásticamente en el músculo inmediatamente después del ejercicio excéntrico y Jones & Round ⁽³²⁾, hipotetizaron que los radicales libres pueden ser generados cuando la sangre oxigenada vuelve al tejido dañado. Además, un aumento de la xantina oxidasa en el endotelio capilar, ha sido encontrado asociado también con la lesión por perfusión ⁽³²⁾. Sin embargo, como la lesión por perfusión ocurre inmediatamente tras el ejercicio y el aumento de la xantina oxidase es tardío, parece que el aumento de la XO está más relacionado con la participación de las células inflamatorias.

Lowe y col ⁽³⁵⁾ estudiaron la degradación de proteínas tras una lesión inducida por contracción excéntrica en músculos de ratas y verificaron que la velocidad de degradación proteica estaba elevada después de las 48 horas post-ejercicio y se correlacionaba con la infiltración de macrófagos fagocíticos. Verificaron aun que no existían señales de aumento en la degradación del músculo hasta la aparición de células fagocíticas. Los mismos autores, sugirieron que la respuesta inflamatoria juega un papel clave en la

remoción de las proteínas dañadas previo al proceso de regeneración.

Funcionalmente, distintas subclases de macrófagos pueden jugar papeles distintos en la respuesta del músculo a la lesión. Los macrófagos ED1⁺, están presentes en la población circulante de macrófagos y monocitos que invaden la célula lesionada ⁽²⁸⁾, ya los macrófagos ED2⁺, por otro lado, son encontrados como macrófagos residentes en el tejido, lo que permite una respuesta más pronta en el sitio lesionado. Los macrófagos también aumentan los niveles de citoquinas incluyendo la interleukina-1, interleukina-6 y los factores de necrosis tumoral. Las citoquinas pueden exacerbar el daño generado por potenciales mecanismos citotóxicos de otras células inflamatorias, aumentando la producción de radicales libres y liberando enzimas proteolíticas ⁽²⁰⁾. Bruunsgaard y col ⁽⁸⁾, señalaron un aumento en la circulación de citoquinas, interleukina-6, así como la elevación de células NK y células CD8⁺ tras un ejercicio de ciclismo excéntrico.

Aunque no haya una clara demarcación entre las fases degenerativa y regenerativa del proceso de lesión-reparación muscular, en roedores, cuatro a seis días post-ejercicio, empiezan los procesos regenerativos ^(3, 53, 61). Es interesante resaltar, que algunos procesos que degradan el material lesionado, pueden también estar involucrados en la regeneración. La fagocitosis de las fibras necrosadas y la autofagocitosis de fibras supervivientes circundantes, puede producir material para la regeneración como sugiere Salminen ⁽⁵³⁾. La atenuación de la inflamación y el apareamiento simultáneo de miotubos regenerativos, fueron observados en ratas, cuatro a cinco días tras ejercicio, y un incremento en la síntesis de colágeno también fue encontrado por Myllylä y col ⁽⁴¹⁾ durante la fase de reparación.

Las células inflamatorias que actúan en el músculo dañado, también vienen siendo relacionadas con los procesos de reparación celular, y algunos macrófagos pueden jugar un papel importante en estos procesos ⁽⁶⁰⁾. Tras doce horas postejercicio, los macrófagos constituyen el tipo predominante de leucocitos inflamatorios en el local dañado y son las células más activas en la eliminación los desechos celulares ⁽⁶⁰⁾. Dos subpoblaciones de macrófagos, los ED1⁺ y los ED2⁺, han sido observados en músculos de animales

(29,57,60). Los macrófagos ED1⁺, actúan como fagocitos y poseen la función de remoción de los escombros celulares en el tejido necrosado, y los macrófagos ED2⁺, pueden también regular lo proceso siguiente de reparación, ya que ellos aparecen cuando la necrosis muscular está completa y empieza la regeneración muscular (57,60).

La influencia de las células inflamatorias sobre la regeneración muscular, está relacionada con el papel fagocítico de las mismas sobre la lisis y los escombros – fragmentos miofibrilares, así como la habilidad que tienen para liberar los factores de crecimiento (42). Los factores de crecimiento pueden controlar la replicación y diferenciación de las células satélites a mioblastos, así como la fusión de ellos a miotubos, los cuales se maduran a miofibras (22). La reparación del músculo esquelético lesionado empieza con la activación de células satélites, que están localizadas entre la lamina basal y el sarcolema. En el músculo sóleo de rata, la respuesta proliferativa de las células satélites alcanza su máximo con 24 horas después de un agudo estímulo excéntrico basado en carrera, y esa respuesta esta relacionada con la cantidad de degeneración y necrosis de la fibra (16). Simultáneamente, sin embargo, no se observó daño en el músculo EDL, pero hubo una evidente respuesta de las células satélites. Así, el estadio patológico de un músculo podría ser estimado exactamente utilizándose cortes seriales realizados a lo largo del músculo, porque

constantes lesiones pequeñas en la fibra, son capaces de activar las células satélites asociadas con la fibra (54).

Resumiendo, la respuesta a la lesión tisular comprende una serie de eventos los cuales son relativamente similares no importa el tejido envuelto, aunque cada órgano contenga especializadas células y singulares matrices extracelulares las cuales determinan algunas especificidades. Así, el reclutamiento de células inflamatorias es el primer evento siguiente a la lesión y está direccionado a neutralizar los agentes dañinos y remover el tejido necrosado. Eso es seguido por una proliferación y migración de miofibroblastos, las cuales penetran en la herida y secretan matriz extracelular. La tercera fase, la matriz extracelular es remodelada y se posible, regeneración del parenquima celular reconstituyendo la arquitectura normal del tejido. En el caso de un prolongado o crónico daño, esas tres fases ocurren simultáneamente y sin la apropiada coordinación, resultando en una crónica inflamación con disfunción del órgano. El desenlace favorable de la inflamación, puede acabar sin secuelas con la regeneración total del tejido lesionado, o bien, con el establecimiento de una reparación incompleta en forma de cicatriz fibrosa.

Palabras Claves: DMT, Lesión Muscular, Daño Muscular, Inflamación Muscular, Ejercicio Excéntrico.

B I B L I O G R A F I A

- 1 ABRAMS, G.O.: "Response of the body to injury: Inflammation and repair". In: Pathophysiology: Clinical concepts of disease processes. S.A. Price and L.M. Wilson (Eds) – 5th ed. Pp 38-58. St Louis – Mosby, 1997.
- 2 ARMSTRONG, R.B., WARREN G.L., WARREN J.A.: "Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury". Sports Med 12(3): 184-207, 1991.
- 3 ARMSTRONG, R.B.: "Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review". Med. Sci. Sports Exerc. 16(6): 529-538, 1984.
- 4 BAUER, E.A., COOPER, T.W., HUANG, J.S., ALTMAN, J., DEUEL, T.F.: "Stimulation of in vitro human skin collagenase expression by platelet-derived growth factor". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82(12): 4132-4136, 1985.
- 5 BELCASTRO, A.N., PARKHOUSE, W., DOBSON, G., GILCHRIST, J.S.: "Influence of exercise on cardiac and skeletal muscle myofibrillar proteins". Mol Cell Biochem 83(1): 27-36, 1988.
- 6 BELCASTRO, A.N., SHEWCHUK, L.D., RAJ, D.A.: "Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis". Mol Cell Biochem 179(1): 135-145, 1998.
- 7 BELCASTRO, A.N.: "Skeletal muscle calcium-activated neutral protease (Calpain) with exercise". J Appl Physiol 74(3): 1381-1386, 1993.
- 8 BRUNSGAARD, H., GALBO, H., HALKJAERKRISTENSEN, J., JOHANSEN, T.L., MACLEAN, D.A., PEDERSEN, B.K.: "Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage". J Physiol 499(Pt 3): 833-841, 1997.
- 9 BULLARD, B., SAINSBURY G., MILLER, N.: "Digestion of proteins associated with the Z-disc by calpain". Journal of muscle Research and Cell Motility 11(3): 271-279, 1990.
- 10 BUSCH, W.A., STROMER, M.H., GOLL, D.E., SUZUKI, A.: "Ca 2+ -specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle". J Cell Biol 52(2): 367-81, 1972.

- 11 **CARPENTER, S., KARPATI, G.:** "Segmental necrosis and its demarcation in experimental micropuncture injury of skeletal muscle fiber". *J Neuropathol Exp Neurol* 48(2): 154-170, 1989.
- 12 **CLARKSON, P.M., SAYERS, S.P.:** "Etiology of exercise-induced muscle damage". *Can J Appl Physiol* 24(3): 234-248, 1999.
- 13 **CULLEN, M.J., APPELYARD, S.T., BINDOFF, L.:** "Morphologic aspects of muscle breakdown and lysosomal activation". *Ann NY Acad Sci* 317: 440-464, 1979.
- 14 **CULLEN, M.J., FULTHORPE, J.J.:** "Phagocytosis of the A-band following Z line and I band loss. Its significance in skeletal muscle breakdown". *Pathology* 138(2): 129-143, 1982.
- 15 **CZOP, J.K., KADISH, J.L., AUSTEN, K.F.:** "Purification and characterization of protein with fibronectin determinants and phagocytosis-enhancing activity". *J Immunol* 129(1): 163-167, 1982.
- 16 **DARR, K.C., SCHULTZ, E.:** "Exercise-induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle". *J Appl Physiol* 63(5): 1816-1821, 1987.
- 17 **DAYTON, W.R., REVILLE, W.J., GOLL, D.E., STROMER, M.H.:** "A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme". *Biochemistry* 15(10): 2159-2167, 1976.
- 18 **DAYTON, W.R., SHOLLMYER, J.V., CHAN, A.C., ALLEN, C.E.:** "Elevated levels of a calcium-activated muscle protease in rapidly atrophying muscle from vitamin E-deficient rabbits". *Biochem Biophys Acta* 548(12): 216-230, 1979.
- 19 **DONKOR, I.O.:** "A survey of calpain inhibitors". *Curr Med Chem* 7(12): 1171-88, 2000.
- 20 **EVANS, W.J., CANNON, J.G.:** "The metabolic effects of exercise-induced muscle damage". *Exerc Sports Sci Rev* 19: 99-125, 1991.
- 21 **FIELDING, R.A., MANFREDI, T.J., DING, W., FIATARONE, W., EVANS, J., CANNON, J.G.:** "Acute phase response in exercise III. Neutrophil and IL-1b accumulation in skeletal muscle". *Am J Physiol* 265(1): R166-R172, 1993.
- 22 **FLORINI, J.R., EWTON, D.Z., MAGRI, K.A.:** "Hormones, growth factors, and myogenic differentiation". *Annu Rev Physiol* 53: 201-216, 1991.
- 23 **FRIDEN, J., SJÖSTROM, M., EKBLÖM, B.:** "A morphological study of delayed muscle soreness". *Experientia* 37(5): 506-507, 1981.
- 24 **FRIDÉN, J., SJOSTROM, M., EKBLÖM, B.:** "Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man". *Int. J. Sports Med.* 4(3): 170-176, 1983.
- 25 **FUKAI, F., SUZUKI, H., SUKUKI, K., TSUGITA, A., KATAYAMA, T.:** "Rat plasma fibronectin contains two distinct chemotactic domains for fibroblastic cells". *J Biol Chem* 266(14): 8807-8813, 1991.
- 26 **HELLSTEN, Y., FRANDSEN, U., ØRTHENBLAD, N., SJÖDIN, B., RICHTER, E.A.:** "Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: A role in inflammation". *J Physiol* 498(Pt 1): 239-248, 1997.
- 27 **HELLSTEN, Y., HANSSON, H.A., JOHANSON, L., FRANDSEN, U., SJÖDIN, B.:** "Increased expression of xanthine oxidase and insulin-like growth factor I (IGF-I) immunoreactivity in skeletal muscle after strenuous exercise in humans". *Acta Physiol Scand* 157(2): 191-197, 1996.
- 28 **HEUFF, G., VAN DER ENDE, M.B., PREVOO, W., BAYON, L.G., BOUTKAN, H.:** "Macrophage populations in different stages of induced hepatic metastases in rats: An immunohistochemical analysis". *Scand J Immunol* 38(1): 10-16, 1993.
- 29 **HONDA, H., KIMURA, H., ROSTAMI, A.:** "Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle". *Immunology* 70(2): 272-277, 1990.
- 30 **HOWELL, J.N., FALKNER, J., CHLEBOUN, G.:** "Blood flow to skeletal muscle during post exercise muscle soreness in humans". *Prog Clin Biol Res* 327: 789-793, 1990.
- 31 **ISHIURA, S., SUGITA, H., NOKASA, I., IMAHORI, K.:** "Calcium-activated neutral protease. Its localization in the myofibril, especially at the Z-band". *J Biochem* 87(1): 343-346, 1980.
- 32 **JONES, C., ALLEN, T., TALBOT, J., MORGAN, D.L., PROSKE, U.:** "Changes in the mechanical properties of human and amphibian muscle after eccentric exercise". *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 76(1): 21-31, 1997.
- 33 **KOH, T.J., TIDBALL, J.G.:** "Nitric oxide inhibits calpain-mediated proteolysis of talin skeletal muscle cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 279(3): C806-12, 2000.
- 34 **LIEBER, R.L., THORNELL, L., FRIDEN, J.:** "Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction". *J Appl Physiol* 80(1): 278-284, 1996.
- 35 **LOWE, D.A., WARREN, G.L., INGALLS, C.P., BOORSTEIN, D.B., ARMSTRONG, R.B.:** "Muscle functions and protein metabolism after initiation of eccentric contraction-induced injury". *J Appl Physiol* 79(4): 1260-1270, 1995.
- 36 **MACINTYRE, D.L., REID, W.D., MCKENZIE, D.C.:** "Delayed muscle soreness: The inflammatory response to muscle injury and its clinical implications". *Sports Med* 20: 24-40, 1995.
- 37 **MATSUMOTO, T., OKITANI, A., KITAMURA, Y., KATO, H.:** "Mode of degradation of myofibrillar proteins by rabbit muscle cathepsin D". *Biochem Biophys Acta* 755(1): 76-80, 1983.
- 38 **MELLGREN, R.L., CARR, T.C.:** "The protein inhibitor of calcium-dependent proteases: purification from bovine heart and possible mechanisms of regulation". *Archiv Biochem Biophys* 225(2): 779-786, 1983.

- 39 **MELLGREN, R.L.:** "Calcium-dependent protease: an enzyme system active at cellular membranes?". *FASEB J* 1(2): 110-115, 1987.
- 40 **MURACHI, T., TANAKA, K., HATANAKA, M., MURAKAMI, T.:** "Intracellular Ca²⁺-dependent protease (Calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (Calpastatin)". *Advances in Enzyme Regulation* 19: 407-424, 1981.
- 41 **MYLLYLÄ, R., SALMINEN, A., PELTONEN, L., TAKALA, T.E.S., VIHKO, V.:** "Collagen Metabolism of mouse skeletal muscle during repair of exercise injuries". *Pflügers Arch* 407(1): 647-670, 1986.
- 42 **NATHAN, C.F.:** Secretory products of macrophages". *J Clin Invest* 79(2): 319-326, 1987.
- 43 **NEWHAM, D.J., MCPHAIL, G., MILLS, K.R., EDWARDS, R.H.T.:** "Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle". *J. Neurol. Sci.* 61(1): 109-122, 1983.
- 44 **NIELSEN T.B., FIELD, J.B., DEDMAN, J.R.:** "Association of calmodulin with lysosomes". *Journal of Cell Science* 87(Pt 2): 327-336, 1987.
- 45 **NOSAKA, K., CLARKSON, P.M.:** "Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors". *Med Sci Sports Exerc* 28(8): 953-961, 1996.
- 46 **OGILVIE, R.W., ARMSTRONG, R.B., BAIRD, K.E., BOTTOMS, C.L.:** Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically-biased exercise". *Am J Anat* 182(4): 335-346, 1988.
- 47 **ORIMO, S., HIYAMUTA, E., ARAHATA, K., SUGITA, H.:** "Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis". *Muscle Nerve* 14(6): 515-520, 1991.
- 48 **PONTREMOLI, S., MELLONI, E.:** "Extralyosomal protein degradation". *Annu Rev Biochem* 55: 455-481, 1986.
- 49 **POSTLETHWAITE, A.E., KANG, A.H.:** "Collagen-and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes". *J Exp Med* 143(6): 1299-1307, 1976.
- 50 **POUSSARD, S., DUVERT, M., BALCERZAK, D., RAMASSAMY, S., BRUSTIS, J.J., COTTIN, P., DUCASTAING, A.:** "Evidence for implication of muscle-specific calpain (p 94) in myofibrillar integrity". *Cell Growth Differ* 7(11): 1461-9, 1996.
- 51 **RAJ, D.A., BOOKER, T.S., BELCASTRO, A.N.:** "Striated muscle calcium-stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise". *Pflugers Archiv* 435(6): 804-809, 1998.
- 52 **RODEMANN, H.P., GOLDBERG, A.L.:** "Arachidonic acid, prostaglandin E2 and F2 a influence rates of protein turnover in skeletal and cardiac muscle". *J Biol Chem* 257(4): 1632-1638, 1982.
- 53 **SALMINEN, A.:** "Lysosomal changes in skeletal muscle during the repair of exercise injuries in muscle fibers". *Acta Physiol Scand Suppl* 539: 1-31, 1985.
- 54 **SCHULTZ, E.:** "Satellite cell behavior during skeletal muscle growth and regeneration". *Med Sci Sports Exerc* 21(5): S181-S186, 1989.
- 55 **SCHWANE, J.A., JONSON, S.R., VANDENAKKER, C.B., ARMSTRONG, R.B.:** "Delayed-onset muscular soreness and plasma CPK and LDH activities after downhill running". *Med. Sci. Sports Exerc.* 15(1): 51-56, 1983.
- 56 **SCHWARTZ, W.N., BIRD, J.W.C.:** "Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D". *Acta Bilo Med Ger* 36(11-12): 1587-1604, 1997.
- 57 **ST PIERRE, B.A., TIDBALL, J.G.:** "Differential response of macrophage subpopulations to soleus reloading after rat hindlimb suspension". *J Appl Physiol* 77(1): 290-297, 1994.
- 58 **STEENBERGEN, C., HILL M.L., JENNINGS, R.B.:** "Cytoskeletal damage during myocardial ischaemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart". *Circ Res* 60(4): 478-486, 1987.
- 59 **SULTAN, K.R., DITTRICH, B.T., PETTE, D.:** "Calpain activity in fast, slow, transforming, and regeneration skeletal muscle of rat". *Am J Physiol Cell Physiol* 279(3): C639-647, 2000.
- 60 **TIDBALL, J.G.:** "Inflammatory cell response to acute muscle injury". *Med Sci Sports Exerc* 27(7): 1022-1032, 1995.
- 61 **VIHKO, V., SALMINEN, A., RANTAMÄKI, J.:** "Acid hydrolase activity in red and white skeletal muscle of mice during a two-week period following exhausting exercise". *Pflügers Arch* 378(2): 99-106, 1978.
- 62 **WROGEMANN, K., PENA, S.D.J.:** "Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases". *Lancet* 27(1): 672-674, 1976.
- 63 **ZAMMIT, V.A., NEWSHOLME, E.A.:** "Effects of calcium ions and adenosine diphosphate on the activities of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase from the radular muscle of the whelk and flight muscle of insects". *Biochem J* 154(3): 677-687, 1976.