



BIOFÍSICA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO FATIGA MUSCULAR

Departamento de Biofísica

Profesor Gustavo Brum

Profesor Agregado Gonzalo Pizarro

Componentes del equipo

Diego Rienzi

Facundo Del Campo

Juan Escuder

Santiago Laporta

Índice de contenidos.

Resumen.....	2
Fundamentación y objetivos de la propuesta.....	2
Introducción.....	2 – 5
Criterios de selección y búsqueda bibliográfica.....	6
Metodología de estudio de la fatiga.....	6 – 9
Alteraciones de la excitabilidad.....	9 – 11
Compartimentos de Ca^{2+}	11 – 13
Velocidad de acortamiento y fuerza mecánica.....	13 – 14
Modificaciones en la relajación.....	14 – 15
Flujo de sangre y PO_2	15 – 16
Cambios Metabólicos en la fatiga.....	16 – 24
Conclusiones finales.....	24
Anexo.....	25 – 28
Bibliografía.....	29 – 38

Resumen. El uso intenso y repetido de los músculos produce un declinar de su performance conocido como fatiga muscular. Durante la fatiga se ven afectadas muchas propiedades del músculo como su excitación, la concentración de iones intra y extracelulares, y diversos cambios metabólicos. La acumulación intracelular de lactato e hidrogeniones que causan deterioro de la función en las proteínas contráctiles, probablemente tenga limitada importancia en el proceso de fatiga de mamíferos. Otros mecanismos que serán considerados son los efectos de los cambios iónicos en el potencial de acción, falla en la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático y los efectos de las especies reactivas de oxígeno. Es un gran desafío identificar la importancia individual de los tantos mecanismos implicados en la fatiga bajo diferentes circunstancias. Más aun cuando la mayor parte de los estudios sobre los mecanismos de fatiga son realizados en músculos aislados y hay que aplicar su información y resultados a los animales intactos o incluso en enfermedades humanas.

Fundamentación y objetivos de la propuesta. Tanto en las actividades diarias como en el deporte, así como en estados patológicos la actividad muscular intensa puede desencadenar fatiga. A este estado contribuyen cambios a nivel del sistema nervioso, cambios metabólicos en el organismo y cambios locales a nivel del músculo propiamente dicho. Estos últimos son muy relevantes y la comprensión de los mecanismos involucrados podría contribuir a desarrollar estrategias que permitan mejorar la performance muscular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. El objetivo general de este trabajo es revisar este aspecto analizando las diferentes alteraciones que ocurren a nivel celular en la fatiga y realizando una puesta al día del tema. Como objetivo más específico intentaremos valorar el peso relativo de cada uno de los factores involucrados en este proceso.

Introducción. En la placa motora se produce la liberación de acetilcolina (Ach) producto de la estimulación nerviosa, uniéndose a sus receptores nicotínicos del sarcolema. Esto produce un cambio conformacional que permite la apertura de estos canales. Consecuentemente una corriente entrante despolariza la membrana en la placa determinando el disparo de un potencial

de acción (PA) a ese nivel. Los canales de Na^+ dependientes del voltaje son los encargados de propagar ese PA y despolarizar el resto de la membrana muscular. Posterior a la despolarización por la entrada de Na^+ , se produce un flujo de salida de K^+ dando comienzo a la repolarización. El sarcolema presenta invaginaciones llamados túbulos T, cada uno de estos esta en relación a sus lados con dos cisternas del retículo sarcoplasmático (RS) conformando la tríada. Cuando el PA se propaga hasta los túbulos T determina la salida Ca^{2+} desde el RS hacia el citoplasma a través de los canales de liberación de Ca^{2+} (RyR1). El Ca^{2+} liberado se une a la troponina C, permitiendo la unión de la actina con la miosina determinando la contracción muscular. Al final de cada contracción son las bombas las encargadas de restablecer el gradiente electroquímico inicial del sarcolema ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$) y la recaptación del Ca^{2+} hacia el RS (bomba de Ca^{2+}).

La fatiga muscular es el declinar de la performance de un músculo, resultado de su uso intenso y repetido (Allen y cols., 2008). El tejido muscular que se contrae en forma intensa presenta disminución de la tensión desarrollada, la cual se recupera totalmente después de un período de descanso. Este fenómeno reversible es a lo que llamamos fatiga muscular. Para analizar este proceso hay que tener en cuenta que se producen cambios tanto metabólicos como en el potencial de acción durante el mismo.

Es necesario aclarar la diferencia entre fatiga y lesión muscular, ya que se trata de dos fenómenos que pueden superponerse en algunas condiciones. Conceptualmente son procesos diferentes aunque ambos producen declinar en la performance muscular. La recuperación en la fatiga es total y ocurre en la primera hora, en la lesión muscular la recuperación es sumamente lenta y puede inclusive no ser total (Edwards y cols., 1977).

Es oportuno hacer una distinción en cuanto al origen de la fatiga. En contracciones voluntarias los músculos son estimulados por vías neuronales complejas que comienzan en la corteza y guían la excitación hasta motoneuronas en la médula espinal. El axón de estas neuronas lleva el potencial directamente a la unión neuromuscular. El proceso dentro de la médula hacia arriba es considerado fatiga central, mientras que el proceso en

el nervio periférico, la unión neuromuscular y en el músculo propiamente dicho es definida como fatiga periférica.

Una variable a tener en cuenta en el estudio de la fatiga es que existen distintos tipos de fibra, con distinta velocidad de contracción, manejo del Ca^{2+} intracelular, capacidad oxidativa y lo que es más importante, diferente resistencia. La clasificación más actual en músculo esquelético de mamífero es basada en la expresión de las diferentes isoformas de las cadenas pesadas de miosina. Estas isoformas determinan la velocidad máxima de acortamiento de las células musculares siendo las fibras tipo I lentas, las tipo IIa de velocidad intermedia y la IIx rápidas. Sin embargo hay que destacar que algunas células varían su velocidad de acortamiento expresando la misma isoforma de las cadenas pesadas, lo cual demuestra que la velocidad depende también de otros factores como las cadenas livianas de miosina. Esta clasificación de fibras musculares basada en la expresión de cadenas pesadas de miosina adquiere mayor relevancia en el estudio de la fatiga y su relación con los cambios metabólicos, porque las isoformas rápidas van a consumir ATP (adenosin-trifosfato) más rápido que las isoformas lentas. Algo similar ocurre con las bombas de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático, de las cuales hay dos isoformas, las SERCA1a en las fibras rápidas y las SERCA2a en las fibras lentas. Se cumple el mismo principio que con las cadenas de miosina porque las bombas están en mayor densidad en las fibras rápidas que en las lentas, por lo tanto producen un mayor consumo de ATP. Sin embargo parece ser la densidad de mitocondrias y su capacidad de usar el metabolismo oxidativo lo que determina la resistencia celular a la fatiga. De todas formas podemos decir que las fibras lentas tipo I son más resistentes a la fatiga que las fibras tipo II.

Mecanismos de fatiga. Se enumerarán brevemente los distintos mecanismos que pueden contribuir a la fatiga a nivel celular que serán desarrollados más adelante.

Alteraciones de la excitabilidad: Esta sección se centrará en aquellos aspectos de la producción de la fatiga que involucran la generación y propagación del potencial de acción.

Cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS: Se ha propuesto que la fatiga podría deberse a alteraciones en las concentración de Ca^{2+} dentro del RS. En este

trabajo se describirá como se alteran la liberación de Ca^{2+} y la respuesta motora en función de lo anterior.

Modificaciones en la contractilidad: Se discutirá como la fatiga afecta diferencialmente a los músculos durante contracciones isométricas y con acortamiento.

Alteraciones en la relajación: En la fatiga los músculos se relajan más lentamente. Los mecanismos de esto así como su rol funcional en la fatiga serán analizados.

Alteraciones en la perfusión y suministro de O_2 : En los músculos intactos, la oferta de O_2 depende del flujo de sangre y la difusión de O_2 desde los capilares a través del espacio intersticial hasta la fibra muscular. Una interrogante que plantea Sutton (1992), es si la oferta de O_2 es siempre adecuada o si hay condiciones en que la misma sea limitada y por ende se produzca fatiga más rápidamente.

Cambios metabólicos: Nos centraremos en esta revisión en las fibras musculares rápidas, en las cuales los cambios metabólicos generalmente son mayores y la disminución de la fuerza es más marcada. Una característica de las fibras rápidas del músculo es que consumen ATP, produciendo ADP (adenosin-difosfato) y Pi (fosfato inorgánico), mucho más rápido de lo que lo regenera. Esto se acompaña además de otros cambios metabólicos en las concentraciones de ATP, AMP, Pi, Mg^{2+} , etc.

La glucólisis anaerobia es de central importancia en el músculo fatigado ya que se da rápidamente y lleva a la producción de lactato e H^+ (Fitts, 1994). El glucógeno es la principal fuente de energía en el músculo y es rápidamente consumido durante el ejercicio intenso por la glucólisis anaerobia.

Otro factor de importancia es la acumulación de especies reactivas de O_2 . Hay cada vez más bibliografía estableciendo su rol en la fatiga muscular.

Muchos procesos celulares pueden contribuir finalmente a la fatiga, pero es un desafío identificar los diferentes mecanismos que intervienen bajo diferentes circunstancias. Muchos de estos han sido estudiados en tejido muscular aislado por lo cual es un desafío todavía mayor usar el conocimiento generado en este tipo de estudios e identificar los mecanismos que se ponen en juego en la fatiga de un animal intacto y particularmente en el ser humano.

Criterios de selección de artículos y búsqueda bibliográfica. Se comenzó utilizando los motores de búsqueda bibliográfica para acceder a revisiones acerca del tema. A partir de estas, se profundizó en los artículos citados. Se seleccionaron aquellos trabajos que utilizaron músculo esquelético tanto in vivo como in vitro, focalizados en alguno de los mecanismos implicados en el desarrollo de la fatiga muscular.

Metodología de estudio de la fatiga.

Modelos de estudio del músculo. La metodología ideal para el estudio de la fatiga es con músculos intactos, perfundidos, y bajo el control central, lo más cercano al estado fisiológico posible. En los distintos grupos musculares, es fácil de medir la disminución de la fuerza y los músculos pueden ser estudiados por electromiografía (EMG), resonancia magnética o biopsia. Una dificultad con cada uno de estos enfoques es que los músculos están constituidos por distintos tipos de fibras con propiedades muy diferentes, lo que dificulta la interpretación. En el animal intacto la fatiga tiene un componente en el sistema nervioso central. Por lo tanto una variante útil de este enfoque es producir la fatiga mediante la estimulación del nervio o músculo directamente, eliminando de ese modo la contribución central.

Muchos estudios de la fatiga se han realizado en músculos enteros aislados. Debido a la ausencia de la circulación, tales preparaciones inevitablemente desarrollan gradientes de difusión de O_2 , K^+ , y otras sustancias en el espesor del músculo. Los mecanismos aparentes de la fatiga es probable que estén sesgados por estos efectos. Mediante contracciones tetánicas repetidas en músculo aislado de ratón se estudió la contribución relativa de la acumulación extracelular de K^+ , ácido láctico o de hipoxia a la fatiga muscular, y bajo estas condiciones experimentales, la hipoxia fue el factor más importante.

Preparados de una única fibra aislada, eliminan los problemas de suministro de O_2 y los gradientes extracelulares de K^+ y de otras sustancias. Éste es el principal beneficio con respecto a los preparados de músculos enteros. Otra ventaja importante es que sólo hay un tipo de fibra bajo investigación. Típicamente las fibras únicas se estimulan con electrodos de placa de modo que el potencial de acción se genera de forma simultánea en múltiples puntos a lo largo de la fibra, eliminando la propagación longitudinal del potencial de

acción como un posible mecanismo de la fatiga. La estimulación prolongada de alta frecuencia aplicada focalmente a una sola región de fibra muscular produce una mayor y más rápida pérdida de fuerza que la que se produce cuando se aplica la estimulación a lo largo de la longitud de la fibra a través de electrodos paralelos (Cairns y cols., 2003; Lännergren y cols., 1986). Esto puede indicar que el fallo de la transmisión del potencial de acción longitudinal es un mecanismo de fatiga importante en esta situación. Sin embargo, esta pérdida de fuerza puede reflejar problemas metodológicos con la estimulación eléctrica focal en experimentos in vitro. Este tipo de falla probablemente no ocurriría normalmente in vivo en seres humanos sanos.

Fibras individuales no sobreviven bien a temperaturas de 37°C o superiores (Lännergren y cols., 1987), por razones que no están del todo claras, pero parecen implicar la producción de especies reactivas de O₂, (Moopanar y Allen, 2005). Así, una gran parte de la fatiga de los mamíferos se ha estudiado a temperaturas no fisiológicas, un tema que está adquiriendo cada vez más importancia.

Para estudiar la fatiga se han utilizado ampliamente fibras peladas, en las cuales la membrana ha sido eliminada, ya sea químicamente o mecánicamente. Su principal ventaja es que la solución intracelular puede ser diseñada previamente, y es posible examinar los efectos de cambiar metabolitos individuales, lo cual es imposible en las preparaciones de fibras únicas. Fibras peladas se utilizaron tradicionalmente para examinar la respuesta de las proteínas contráctiles en relación a la concentración de Ca²⁺. Sin embargo, también pueden ser utilizados para estudiar la liberación o recaptación de Ca²⁺ por medio del RS. Una desventaja de este tipo de preparado es que no es posible determinar si una proteína está presente en el medio intracelular o no.

Un gran número de componentes subcelulares también se ha estudiado como parte de intentos de comprender la función muscular durante la fatiga. Por ejemplo, vesículas del RS se han aislado de músculos en un intento de entender su papel en dicho proceso. La liberación por parte del RS es difícil de estudiar por tales métodos, porque los métodos de estimulación de la liberación producen en realidad una tasa de liberación más lenta que el mecanismo fisiológico. Al igual que en otras áreas de la biología, los estudios de elementos

aislados de una célula puede ser muy eficaz en la definición de mecanismos, pero son generalmente incapaces de demostrar relevancia fisiológica.

Tipos de estimulación. En los distintos tipos de estimulación o de contracción, la fatiga se expresa de forma diferente y así mismo su recuperación. Es evidente que el declinar de la función muscular no es inmediatamente apreciable durante una actividad submáxima, en esta situación la fatiga se manifiesta como la incapacidad de mantener la actividad con la intensidad original. Esto puede quedar en evidencia forzando una actividad máxima sobre el mismo músculo.

Si el músculo es estimulado de forma continua a una frecuencia cercana a la que resulta de una contracción a fuerza máxima, la performance decae rápidamente, esto es llamado fatiga de alta frecuencia (Bigland y cols., 1979). Una característica de este tipo de fatiga es que su recuperación es también muy rápida, teniendo un componente de recuperación de solo 1 o 2 segundos. En humanos este tipo de contracción puede ser encontrada en el levantamiento de un objeto pesado. Es importante destacar que contracciones al 50% o más de la capacidad muscular colapsan la circulación sanguínea, en consecuencia, la contracción continúa en un músculo isquémico. Es recién en el reposo que se va a recuperar la perfusión (Barcroft y Millen, 1939). Esto va a tener repercusiones en los cambios metabólicos que se dan durante la fatiga.

Otra forma de estudio de la fatiga es la contracción tetánica de baja frecuencia, la cual simula muchas actividades naturales como caminar o respirar. Este tipo de estimulación muscular lleva a una fatiga menor que la fatiga de alta frecuencia descrita anteriormente, pero su recuperación es más lenta (5 a 10 minutos).

Edwards y cols. (1977) estudiaron las dos formas de estimulación muscular en humanos y llegaron a la conclusión que en la fatiga de alta frecuencia hay un tiempo medio de recuperación de 5 minutos. Por otra parte en las contracciones tetánicas de baja frecuencia la recuperación tiene un tiempo medio de 1 a 2 horas y luego de esto persiste una pequeña sensación de debilidad muscular que dura un día aproximadamente. Presumiblemente la explicación radica en que para lograr la fuerza necesaria para una actividad determinada el cerebro aumenta la frecuencia de disparos para un músculo

determinado e interpreta esa información como debilidad, aun cuando no haya disminución de la fuerza máxima de dicho músculo.

Alteraciones de la excitabilidad. El potencial de reposo se debe a una desigual concentración de iones en los compartimientos intra y extracelular y a la permeabilidad selectiva de la membrana. Los potenciales de acción resultan tanto en el músculo como en el nervio, de la presencia de canales sensibles al voltaje.

La contracción de músculo normal depende de la excitación eléctrica de la fibra muscular. Siempre que la fibra muscular se polariza correctamente, la transmisión neuromuscular inicia un potencial de acción, que se propaga muy rápidamente a lo largo de la superficie de la fibra muscular y luego mucho más lentamente en todo el túbulo T.

En el músculo adulto, la corriente de sodio se lleva a cabo por una rápida activación e inactivación de canales dependientes de voltaje (Jurkat-Rott y cols., 2006). La densidad de estos canales de Na^+ es mayor en el músculo de contracción rápida que en el de contracción lenta y es aproximadamente tres veces más alta cerca de la unión neuromuscular que en los extremos de la fibra (Ruff, 1992), presumiblemente para proporcionar un factor de seguridad para la iniciación del potencial de acción.

Aunque el número total de canales de Na^+ en el sarcolema es similar a la que hay en el túbulos T (Jaimovich y cols., 1976), esta última tiene cinco veces la superficie del sarcolema (Dulhunty, 1984). Por lo que la densidad de canales de Na^+ en los túbulos T es menor que en el sarcolema.

Las fibras musculares deben estar bien polarizadas para obtener una adecuada activación de los sensores de voltaje. La despolarización crónica interfiere con dos procesos clave: i) Los canales de Na^+ dependientes de voltaje se vuelven disfuncionales debido a un aumento de la inactivación lenta (Ruff, 1996) y rápida (Filatov y cols., 2005) y ii) Los mismos sensores de voltaje dejan de responder (Adrian y cols., 1976; Rios y Pizarro, 1991) de modo que incluso una despolarización directa del túbulo T no puede activar por completo la liberación de Ca^{2+} (Dulhunty, 1992).

Una gran proporción de los canales de Na^+ debe ser inactivada para que haya un fracaso completo del potencial de acción. Esto se produce con la despolarización prolongada a potenciales menos negativos. En el músculo de rata entre -60 y -55 mV (Rich y Pinter, 2003) y en el músculo de la rana a -50mV (Lannergren y Westerblad, 1986). El fracaso de un potencial de acción puede ocurrir si el gradiente electroquímico para el Na^+ se reduce, ya sea por una disminución $[\text{Na}^+]$ extracelular, como podría ocurrir en el túbulo T durante la intensa activación repetitiva (Bezanilla y cols., 1972), o por un aumento intracelular de $[\text{Na}^+]$ (Nielsen y cols., 2004). Otra forma de que fracase el potencial de acción es que haya un aumento en la permeabilidad para K^+ o Cl^- en el sarcolema o en el túbulo T. Esto es debido a que un potencial de acción sólo puede propagarse si la corriente entrante de Na^+ es tanto mayor a la saliente de K^+ y Cl^- como para despolarizar la membrana adyacente al umbral (Stephenson, 2006). Por ejemplo, la estimulación repetida de una fibra muscular puede disminuir la $[\text{ATP}]$ intracelular (Frink y cols., 1983), lo que imposibilita mantener cerrados los canales de K^+ sensibles a ATP. En consecuencia, aumenta considerablemente la corriente de fuga de K^+ , reduciendo la excitabilidad del sistema T a pesar de que la fibra este bien polarizada. Hay numerosa literatura que muestra que la activación repetida de un músculo causa un flujo neto de salida de K^+ (Clausen y cols., 2003), aumento extracelular, y disminución intracelular de la $[\text{K}^+]$ (Sjogaard y cols., 1985). Esto es debido al eflujo de K^+ que ocurre con cada potencial de acción. El problema de la acumulación de K^+ es potencialmente mucho mayor en el interior de los túbulos T (Clausen y cols., 2003; Fitts, 1994), porque tienen el 80% del área total de superficie de membrana, pero su volumen es sólo el 1% del volumen total de la fibra.

En algunas circunstancias, los cambios en los gradientes electroquímicos para K^+ que ocurren con la activación repetida causan despolarización sustancial de la membrana, insuficiencia de la excitación, y una reducción en la fuerza de respuesta. Por ejemplo, la estimulación repetida de músculos enteros in vitro durante 5-10 minutos resulta en una disminución de 30% o más en la $[\text{K}^+]$ intracelular y una despolarización de 10 -18 mV en fibras rápidas y lentas de rata y rana (Balog y Fitts, 1996; Juel, 1986). Experimentos sobre este fenómeno sugirieron que parte de la fatiga observada puede ser atribuible a la

excitación inadecuada debido a los cambios de las $[K^+]$ (Balog y Fitts, 1996; Thompson y cols., 1992). Estos cambios no son adecuadamente compensados por la actividad de las bombas Na^+-K^+ y determinan una reducción de los potenciales de acción. También es bien conocido que el aumento de la $[K^+]$ en la solución que baña un músculo in vitro puede despolarizar las fibras, deprimir las respuestas de excitabilidad y disminuir la fuerza de una manera graduada (Carins, 1997). Esta depresión de la excitabilidad y la fuerza se puede invertir en muchas circunstancias por la estimulación de las bombas Na^+-K^+ (Clausen y cols., 2003).

La pregunta es si la excitabilidad muscular disminuye en el ejercicio de los músculos in vivo causando fatiga. Numerosos estudios han examinado lo que ocurre con el potencial de acción en la superficie (onda M) en el transcurso de ejercicio que causa fatiga en humanos. Con una contracción máxima continua y voluntaria del músculo aductor del pulgar durante 60 segundos, la fuerza se redujo en 40-60%, pero la onda M evocada por un único estímulo supra máximo en lugar de disminuirse incrementó, lo que indica que la excitación no había fracasado, al menos no en el sarcolema (Bigland cols., 1979).

La contracción sostenida del cuádriceps al 30% de su capacidad durante 3 minutos redujo la respuesta muscular un 50% y elevó la $[K^+]$ en plasma venoso de 4 a 6 mM, pero no causó ningún cambio en la onda M (West y cols., 1996). Un estudio realizado por Sandiford y cols. (2005) también mostró que no había cambios en la onda M en presencia de fatiga.

En suma, la reducción en la excitabilidad no sería la responsable de la fatiga muscular que ocurre en humanos.

Compartimentos de Ca^{2+} . Con respecto al contenido de los compartimentos de Ca^{2+} se evidenció que la mayoría del Ca^{2+} en el RS está unido a la calsecuestrina (Beard y cols., 2004; Berchtold y cols., 2000). La concentración de Ca^{2+} libre restante es 0,3-1 mM según lo que demostraron los trabajos de Fryer y Stephenson (1996), Gissel y Clausen (1999) y Trinh y Lamb (2006). También en estos mismos estudios, se observó que el RS está cargado en un 25% de su capacidad en las fibras rápidas y en un 70% en las fibras lentas. Por otra parte, en lo que refiere a las bombas de Ca^{2+} , como se mencionó anteriormente en las fibras rápidas se encuentra

predominantemente la isoforma SERCA1a, mientras que en las fibras lentas la SERCA2a. Existe mayor captación de Ca^{2+} en las fibras rápidas por el mayor número de bombas. En relación a la liberación de Ca^{2+} , en el ensayo de Baylor y Hollingworth (2003) con músculo de ratón, se pudo apreciar que con cada potencial de acción se libera 3 veces más Ca^{2+} en el RS de las fibras rápidas. Esto es debido a la elevada densidad de sensores de voltaje DHPR y canales de Ca^{2+} en las fibras rápidas (Delbono y Meissner 1996). Para lograr una rápida contracción en las fibras rápidas se precisa de la presencia de la isoforma MHC (tipo II) y de la liberación rápida de Ca^{2+} . En comparación a las fibras rápidas, las fibras lentas poseen menos sitios de unión de Ca^{2+} con la troponina C, menor cantidad de bombas de Ca^{2+} , menor cantidad de Ca^{2+} liberado y presenta la isoforma MHC (tipo I) (Bortolotto y cols., 2000; Bottinelli y Reggiani, 2000).

En relación a los efectos de los cambios en el contenido de Ca^{2+} del RS y la liberación del mismo se observó que si la cantidad total de Ca^{2+} en el RS de una fibra rápida cae sustancialmente por debajo de sus niveles basales, la cantidad liberada por cada potencial de acción desciende, reduciéndose la fuerza de respuesta (Dutka y cols., 2005; Posterino y Lamb, 2003). Por el contrario, en este último estudio, aumentando la cantidad de Ca^{2+} en el RS hasta 3 veces más del nivel basal (cerca a su capacidad máxima) la cantidad de Ca^{2+} liberado en cada potencial de acción se mantuvo constante. Esto se ve esquematizado en la figura 1 (ver anexo). Esta cantidad constante de Ca^{2+} liberada en cada potencial de acción es debida a efectos de un “feedback” negativo del Ca^{2+} liberado. Por lo anterior la reducción de la cantidad de Ca^{2+} contenido en el RS afecta adversamente la liberación de Ca^{2+} y la respuesta de la fuerza. El contenido de Ca^{2+} en el RS cambiará si hay un flujo neto entrante o saliente de Ca^{2+} a través del sarcolema de una fibra muscular, y estos cambios en el flujo podrían afectar al desarrollo de la fatiga (Zhao y cols., 2005). En los estudios sobre los flujos de Ca^{2+} con fibras aisladas de sapos, el efecto combinado de la salida y la entrada del Ca^{2+} era normalmente bajo, según lo descrito en la revisión de Allen y colaboradores (2008). La experiencia con personas corriendo largas distancias, demostró que el contenido de Ca^{2+} en el músculo vasto externo del cuádriceps aumentaba aproximadamente un 30% después de una corrida de 20 km, pero

no cambiaba significativamente después de correr 10 km (Overgaard y cols., 2004). Estos hallazgos, indican que si bien particularmente las fibras rápidas pueden acumular Ca^{2+} , hay relativamente pocos cambios en el contenido de Ca^{2+} muscular durante el ejercicio, excepto cuando éste es muy prolongado. A pesar de esto, el ADP tendría un rol importante en la existencia de ciertas pérdidas de Ca^{2+} de las bombas. Esto se discutirá más adelante en el apartado de *Cambios metabólicos en la fatiga*. También se discutirá en el mismo, acerca del papel que juegan el fosfato inorgánico y otros factores metabólicos en la liberación del Ca^{2+} y en la sensibilidad al mismo.

Por otra parte, existe el planteo de que las mitocondrias tendrían cierto manejo del contenido de Ca^{2+} . Lo observado en seres humanos es que después de realizar una hora de ejercicio, la cantidad de Ca^{2+} en las mitocondrias se incrementó en un 50% por encima del nivel observado en reposo (Madsen y cols., 1996). Por lo tanto, la mitocondria parece desempeñar al menos un rol menor en los movimientos globales de Ca^{2+} en el acoplamiento excitación - contracción.

Velocidad de acortamiento y fuerza mecánica. Los mecanismos subyacentes en la fatiga inducida por cambios en la producción de fuerza isométrica no son los mismos que los que afectan la velocidad de acortamiento (Allen y cols., 1995). Esto significa que una disminución en la potencia máxima puede depender principalmente de la reducción en la producción de fuerza en algunas situaciones, mientras que la disminución en la velocidad de acortamiento puede ser de mayor importancia en otros casos. Además, la disminución en la producción de fuerza tiene un mayor impacto en la fuerza durante los movimientos que requieren altas fuerzas, y la reducción de la velocidad de acortamiento se vuelve más importante a medida que la velocidad de movimiento aumenta. El costo de energía es considerado mayor durante contracciones repetidas con acortamiento que en condiciones isométricas, y por lo tanto, la fatiga se desarrolla más rápidamente cuando es inducida por contracciones con acortamiento (Beltman y cols., 2004).

Se conoce que en la fatiga están involucrados cambios en la fuerza isométrica, en la velocidad máxima de acortamiento, y en la relación fuerza-velocidad. Se han propuesto diferentes mecanismos de cómo se desarrolla

para cada uno de estos, pero todos afectan sobre todo a la producción de fuerza. El aumento en la concentración intracelular de ADP podría tener un rol central en la fatiga que induce un descenso en la velocidad máxima de acortamiento.

Modificaciones en la relajación. La fatiga del músculo esquelético está generalmente acompañada de una marcada desaceleración de la relajación. Esto puede resultar beneficioso durante una contracción isométrica prolongada (Jones y cols., 1979). Por otra parte, la desaceleración de la relajación puede limitar la performance durante el ejercicio dinámico donde son efectuados movimientos rápidos alternados.

La relajación de las células musculares es un proceso complejo que involucra los siguientes pasos: 1) la detención de la liberación de Ca^{2+} por parte del RS, 2) el Ca^{2+} es recaptado por el RS a través de las bombas de Ca^{2+} , 3) esto resulta en una disminución en la concentración intracelular de Ca^{2+} , por lo tanto éste se disocia de la troponina, y 4) cesa la conformación de puentes cruzados. No hay métodos que permitan medir directamente los cambios, y tampoco separarlos en cada fase. Debido a lo anterior, se diseñaron técnicas donde se mide simultáneamente la fuerza y la concentración intracelular de Ca^{2+} en una fibra muscular aislada para ver cuánto contribuye el manejo del Ca^{2+} por parte del RS y la función miofibrilar. Se usaron fibras de ratones y fibras de rana *Xenopus*, y se vio como los cambios en el manejo del Ca^{2+} por parte del RS y la función de los puentes cruzados ocurren en paralelo durante la inducción de la fatiga. Dentro de los factores metabólicos involucrados en la desaceleración de la relajación, se encuentran los cambios en el ATP, ADP y Pi durante la fatiga que tendrían un impacto directo sobre la miosina y las ATPasas de Ca^{2+} en el RS. Esto fue propuesto en los experimentos de Dawson (1980) y Edwards (1975), y sus respectivos colaboradores. Se puede observar que el aumento de H^+ , ADP y Pi son los factores metabólicos que pueden causar una desaceleración reversible de la relajación en los músculos fatigados.

En lo que refiere al curso de tiempo para lograr la recuperación, este va a depender del tipo de fatiga inducida. La recuperación después de la fatiga producida por contracciones tetánicas cortas y repetidas se completa

generalmente dentro de 30 minutos en las frecuencias altas, mientras que la fuerza en la estimulación de baja frecuencia puede estar marcadamente descendida por muchas horas. Por otro lado, cuando la fatiga es inducida por la estimulación de alta frecuencia continua, se produce una marcada recuperación de la fuerza en los primeros segundos después del cese de la estimulación. Se ha propuesto en el trabajo de Westerblad y cols. (1990) que este componente rápido de recuperación durante varios segundos representa la difusión de K^+ a partir de los túbulos T. Durante una larga contracción tetánica de alta frecuencia, la reducción de la liberación de Ca^{2+} fue evidente en el centro de la fibra muscular, coherente con la acumulación de K^+ despolarizando los túbulos T. Además el tiempo de recuperación para la liberación de Ca^{2+} central y la fuerza es coherente con el tiempo para la difusión hacia afuera de los túbulos T de los iones pequeños. (Nakajima y cols., 1973).

Se observó un tipo específico de pérdida de recuperación de la fuerza de larga duración en músculo aductor del pulgar humano (Edwards y cols., 1977). En este tipo de retraso en la recuperación de la fatiga, la producción de fuerza tetánica está más descendida en bajas que en altas frecuencias de estimulación. Esto es observable en todas aquellas situaciones donde disminuyen tanto la concentración intracelular como la sensibilidad al Ca^{2+} por parte de las miofibrillas. No se conocen los mecanismos exactos involucrados por lo cual se produce el retraso en la recuperación de la fatiga. Puede ser debido primariamente a la reducción de la liberación de Ca^{2+} por el RS, que puede involucrar un aumento en su concentración intracelular, causando deterioro del acoplamiento entre los sensores de voltaje ubicados en los túbulos T y la liberación de Ca^{2+} por parte del RS.

Flujo de sangre y PO_2 intracelular. En el trabajo de Barcroft y Millen (1939), en el que se observó que el flujo sanguíneo cesa en una contracción máxima continua, y bajo estas circunstancias, la falla del suministro de O_2 presumiblemente contribuirá a la rápida fatiga. A través de la RNM es posible determinar la PO_2 en los capilares y el músculo. En reposo las mismas son de 44 y 34 mmHg respectivamente, mientras que durante el ejercicio los valores son de 34 y 3 mmHg (Richardson y cols., 2006). El valor promedio de 3 mmHg no cambia en el músculo siendo el ejercicio leve o intenso, lo que

sugiere que el gradiente de difusión es máximo y que nuevos aumentos de suministro de O_2 debe venir de aumentar el flujo sanguíneo y la apertura de nuevos capilares (Richardson y cols., 1995).

Por lo anterior, es posible concluir que el suministro de O_2 desde los capilares a las fibras musculares proporciona una limitante al rendimiento muscular durante el ejercicio aeróbico prolongado.

Cambios Metabólicos en la fatiga. Para valorar los principales cambios metabólicos que tienen lugar durante la fatiga muscular, es necesario conocer el comportamiento típico de las fibras musculares en este proceso. Los patrones característicos en las fibras rápidas durante la fatiga (Fig. 2) se caracterizan por: i) Fase 1: Rápida disminución de la fuerza tetánica del 10-20% con aumento de $[Ca^{2+}]$ intracelular; ii) Fase 2: Período de fuerza tetánica relativamente constante y iii) Fase 3: Descenso rápido tanto de la fuerza tetánica como de la $[Ca^{2+}]$ intracelular. La fase 2 difiere marcadamente entre las células, lo que refleja diferencias en la capacidad de utilizar el metabolismo oxidativo. Un músculo entero no muestra una fase 2 clara, probablemente porque difiere la resistencia a la fatiga de cada fibra. La disminución inicial de la fuerza de la fase 1, donde aumenta la $[Ca^{2+}]$ intracelular, es causada por una reducción en la capacidad de generar fuerza de los puentes cruzados. En cambio, la rápida disminución de fuerza de la fase 3 sería por efecto combinado del descenso de la $[Ca^{2+}]$ intracelular y el descenso de la sensibilidad miofibrilar al Ca^{2+} . Como se ve en la figura 2 (ver anexo), las fibras lentas tienen mucho mayor resistencia a la fatiga y cambios mucho menores tanto en la disminución de la fuerza como en la $[Ca^{2+}]$ intracelular.

Fosfato Inorgánico (Pi). En el músculo tienen lugar una serie de reacciones que garantizan el suministro de energía para la contracción pero que en la fatiga se transforman en una fuente de Pi. Por la Creatina quinasa (CK): PCr (fosfocreatina) + $ADP \leftrightarrow Cr$ (creatina) + ATP . Por la Adenilato quinasa (AC): $2ADP \leftrightarrow AMP$ (adenosin-monofosfato) + ATP . Dichas reacciones están cercanas al equilibrio, por lo tanto, el consumo neto de ATP lleva a cambios relativamente estereotipados de la concentración de ATP , ADP , Pi , PCr , Cr y AMP . Durante el consumo neto de ATP : i) La concentración de ATP no cambia inicialmente y el efecto neto es una disminución de $[PCr]$ y un aumento de $[Cr]$ y de $[Pi]$. ii) Cuando $[PCr]$ llega a niveles bajos ($<10mM$),

comienza a bajar [ATP] y [ADP] aumenta considerablemente desde 10 μM (concentración basal) hasta 100-300 μM . iii) Cuando [ADP] llega a niveles tan altos, [AMP] también se vuelve considerable y la AMP deaminasa puede degradarlo a NH_3 e IMP. La disminución de [PCr] lleva a un aumento de [Pi] que es considerado una causa mayor de fatiga. Hay sitios de la célula en los cuales el consumo de ATP parece ser mayor. Un posible sitio de descenso local de ATP es el espacio entre el túbulo en T y el RS (sitio de unión de la tríada). En esta región, el número elevado de bombas de calcio y de bombas Na^+/K^+ justifican dicho consumo de ATP (Dutka y Lamb, 2007). Otro factor importante durante la fatiga es que cuando disminuye [ATP], el Mg^{2+} libre aumenta porque ADP, AMP e IMP tienen mucho menor afinidad por el Mg^{2+} que el ATP (Westerblad y Allen, 1992). Esto disminuye la liberación de Ca^{2+} . El intercambio de fosfato entre ATP y PCr es catalizado por CK por la reacción: $\text{PCr} + \text{ADP} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Cr} + \text{ATP}$. Mientras que la Cr tiene poco efecto en la función contráctil, se considera que el Pi elevado puede tener un papel importante en la fatiga muscular. El Pi puede causar un descenso en la producción de fuerza miofibrilar y en la sensibilidad al Ca^{2+} , así como el descenso de la liberación de Ca^{2+} del RS. En cuanto a la producción de fuerza del puente cruzado, la cabeza de la miosina se une primero débilmente al filamento de actina y luego lo hace de manera más fuerte. La liberación del Pi posiblemente permita el aumento en la producción de fuerza (Takagi y cols., 2004). Esto implica que el aumento de Pi inhibe la transición hacia un estado de unión más fuerte del puente cruzado. Menos puentes cruzados van a estar en estado de unión fuerte cuando el Pi aumente durante la fatiga. Concordando con esto, experimentos en fibras peladas mostraron consistentemente un descenso sustancial de la $F_{\text{máx}}$ en presencia de Pi elevado (Pate y Cooke, 1989). Estudios en ratones $\text{CK}^{-/-}$ (carentes de la enzima creatinina quinasa) en su músculo, revelaron un aumento del Pi en reposo pero no una acumulación durante la fatiga. La $F_{\text{máx}}$ de fibras rápidas $\text{CK}^{-/-}$ sin fatiga es marcadamente menor que en las fibras normales (Dahlstedt y cols., 2001). Dichas fibras no mostraron la reducción en la $F_{\text{máx}}$ del 20% que se veía en la fase 1 de la fatiga en las fibras rápidas (Dahlstedt y cols., 2000). Lo anterior se ilustra en la figura 3 (ver anexo). Como conclusión, el aumento de Pi mioplasmático puede inhibir la producción de fuerza por acción directa

en el puente. Es un mecanismo probable de disminución de la fuerza en la fase 1.

Con respecto a la sensibilidad miofibrilar al Ca^{2+} experimentos con fibras musculares peladas mostraron que el Pi aumentado durante la fatiga disminuye la sensibilidad miofibrilar al Ca^{2+} (Martyn y Gordon, 1992). Esto puede tener gran impacto en la producción de fuerza en fases avanzadas de la fatiga cuando disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracelular}}$. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracelular}}$ de la fase 1 no se vio en fibras musculares $\text{CK}^{-/-}$ (Dahlstedt y cols., 2000) pero reapareció tras la inyección de CK (Dahlstedt y cols., 2003). Esto indica el rol central que tiene la CK y el Pi elevado en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracelular}}$ inicial. Se han propuesto varios mecanismos pero actualmente se desconoce el mecanismo exacto por el cual se da esta relación. En el descenso de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracelular}}$ en la fatiga tardía (fase 3) se ha visto que CK y el aumento del Pi juegan un rol central. La inyección de CK en fibras $\text{CK}^{-/-}$ resultó en los cambios conocidos de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{intracelular}}$: aumento inicial y descenso final (Dahlstedt y cols., 2003).

Los mecanismos propuestos para la relación del Pi con el descenso final del Ca^{2+} fueron por un lado la inhibición del canal RyR inducida por el Pi y por otro la precipitación de Ca^{2+} - Pi en el RS. Ambos modelos llevan a una disminución en la cantidad de Ca^{2+} capaz de liberarse del retículo. Es clara la importancia del Pi en este proceso aunque la contribución de cada uno de estos mecanismos no está claramente establecida.

Lactato e H^+ . La acumulación de ácido láctico en el músculo ha sido históricamente sugerida como una causa mayor de fatiga muscular. El lactato y los H^+ son producidos en los músculos durante el ejercicio intenso como se vio en la revisión de Rosbergs y cols. (2004), que a su vez llega a la conclusión de que el aumento de lactato no causa acidosis sino que por el contrario la retarda. El lactato puede alcanzar 30 mM o más, mientras que el pH puede descender aproximadamente 0,5 unidades. Se ha notado una relación temporal cercana entre la disminución de la fuerza muscular y el aumento del lactato e H^+ . Sin embargo, ahora se cree que el efecto deletéreo sobre el músculo fue sobreestimado e incluso podría tener efectos beneficiosos.

En humanos ejercitándose a distinta intensidad, el nivel de lactato no se correlacionó bien con la fatiga muscular (Karlsson y cols., 1975). La adición de lactato extracelular en músculos in vivo (Hogan y cols., 1995) o in vitro resultó en alguna reducción de la $F_{\text{tetánica}}$, pero esto en gran parte se debió al aumento de la osmolaridad extracelular que llevó a mayor fuerza iónica intracelular que inhibe directamente la producción de $F_{\text{tetánica}}$ (Lamb y cols., 1993).

Experimentos con fibras musculares peladas con fuerza iónica constante mostraron que el lactato, incluso a 50 mM o más tenía relativamente poco efecto en la producción de fuerza (redujo <5% la $F_{\text{Máx}}$) y poco o ningún efecto en la sensibilidad al Ca^{2+} del aparato contráctil (Posterino y cols., 2001; Dutka y Lamb, 2000). Por lo recién expuesto, podemos concluir que la acumulación de lactato intracelular por sí mismo no es una causa mayor de fatiga.

En humanos, el pH muscular en reposo es de aproximadamente de 7,05 y después de realizar ejercicio exhaustivo puede caer a 6,5. En algunos casos cae tan solo a 6,9, lo que lleva a pensar que puede haber fatiga sin grandes aumentos de H^+ . En estudios en humanos con deficiencia de monofosforilasa, que no pueden utilizar glucógeno, la fatiga muscular se da mucho más rápidamente y sin caída del pH. Así que claramente la fatiga muscular puede ser causada por otros factores independientes del H^+ (Cady y cols., 1989). Inicialmente el pH aumenta 0,1 unidades por el consumo de H^+ que trae la caída de la PCr. Cuando cesa el ejercicio el pH puede descender 0,1 unidades por la resíntesis de la PCr. La fuerza se recupera mucho más rápido que el pH, lo que indica que no es la responsable por sí misma de la reducción de fuerza (Sahlin y Ren, 1989).

En fibras musculares de ratones, atenuar la caída del pH no redujo la magnitud de la fatiga (Stary y Hogan, 2005). El pH bajo reduce la activación de la liberación de Ca^{2+} estimulada por Ca^{2+} y cafeína (Williams y Ward, 1992). Sin embargo, la activación de la liberación de Ca^{2+} por el sensor de voltaje (mecanismo fisiológico) no es inhibida (Lamb y cols., 1992).

El pH bajo reduce la sensibilidad al Ca^{2+} del aparato contráctil (Fabiato y Fabiato, 1978), probablemente porque el H^+ compite con al Ca^{2+} uniéndose a la TnC. A esto suele atribuírsele efectos deletéreos mayores en la performance del músculo. Sin embargo, el pH bajo reduce mucho la afinidad del Ca^{2+} con la

bomba de Ca^{2+} del retículo. Por esto, a pesar de que la afinidad del Ca^{2+} por la TnC esté disminuida, el Ca^{2+} total uniéndose a la TnC puede no decrecer (incluso puede estar aumentado). La reducción del pH de 7,0 a 6,3 reduce la afinidad del Ca^{2+} con la bomba más de 5 veces, lo que es mucho mayor al efecto que produce en el aparato contráctil (Fabiato y Fabiato, 1978). Podemos concluir entonces que al tener menor afinidad por la bomba, hay más Ca^{2+} libre en el citoplasma, lo que da más fuerza de respuesta y mayor rapidez en el aumento de la fuerza tetánica.

El pH bajo puede tener marcados efectos beneficiosos en la performance muscular ayudando a mantener la excitabilidad. Nielsen y cols. (2001) demostraron que disminuir el pH puede contrarrestar la disminución de la excitabilidad dada por la acumulación de K^+ extracelular, siendo el pH bajo en este sentido protector de la fatiga. Reducir el pH_i disminuye la conductancia de Cl^- de la membrana del túbulo T a la mitad aproximadamente, permitiendo que el potencial de acción continúe propagándose tanto por la superficie como por la membrana del túbulo T y por lo tanto activar la contracción (Pedersen y cols., 2005).

Se demostró en fibras musculares aisladas que bajar el pH de 7,18 a 6,77 no disminuye ni el nivel inicial de $F_{\text{tetánica}}$ ni el momento en que se fatiga la fibra muscular tras estímulos repetidos (Bruton y cols., 1998). De hecho, llevó 98 estímulos tetánicos causar un descenso de fuerza del 40% en condiciones de acidosis contra 63 en condiciones normales. Tampoco hay evidencia que el pH bajo acelere la fatiga muscular decreciendo la glucólisis. Ésta última no se inhibe en condiciones de acidosis como se vio en el trabajo de Bangsbo y cols. (1996), en el que destaca la acumulación de K^+ extracelular como factor clave de la fatiga muscular. Si disminuye el pH corporal, se afecta la performance muscular pero se cree que por acción directa del pH bajo extracelular y no por el intracelular (Spriet y cols., 1985). Si aumenta el pH corporal puede retrasar el inicio de la fatiga pero la alcalosis causa un descenso de $[\text{K}^+]$ extracelular, lo que puede dañar la membrana (Sostaric y cols., 2006).

El incremento de la carnosina muscular por suplemento de beta alanina retrasa el inicio de la fatiga durante el ejercicio en humanos (Hill y cols., 2007). Esto fue atribuido al aumento del pH pero probablemente sea por un incremento en la sensibilidad al Ca^{2+} del aparato contráctil.

Cambios en el ATP y Mg^{2+} . Durante la fatiga intensa en fibras rápidas (Karatzafiri y cols., 2001):

- ATP desciende desde 7 a 1,2 mM
- PCr desciende desde 30 a 2,3 mM
- ADP asciende desde 10 a 200 μ M
- IMP asciende desde indetectable a 5 mM
- Mg^{2+} asciende desde 1 a 2 mM o más

En el estudio en fibras musculares peladas se vió que la producción de fuerza máxima no fue reducida hasta que el ATP descendió a menos 20 μ M e incluso aumentó un 10% con ATP entre 0,5 – 1 mM. Se vió también que la sensibilidad al Ca^{2+} no se altera al disminuir la [ATP] a 0,5 mM (Dutka y Lamb, 2004). Un valor de 3 mM de IMP no tiene efecto en la F_{MAX} y causa un mínimo aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} . Aumentar la [Mg^{2+}] a 3 mM no tiene efecto en la F_{MAX} ni en la velocidad de acortamiento pero causa un descenso marcado de la sensibilidad al Ca^{2+} (Blazey y cols., 1999). En fibras rápidas, el efecto combinado de todo esto probablemente sea un leve aumento de la F_{MAX} y un gran descenso de la sensibilidad al Ca^{2+} . A esto hay que sumarle los efectos del Pi y H^+ (Allen y cols., 2008).

La capacidad de relajación tetánica está 2,5 veces disminuida cuando la [ATP] desciende a 0,5 mM (Dutka y Lamb, 2004). Esto probablemente se deba a la menor capacidad de las bombas del RS de recaptar el Ca^{2+} . Si el ATP está muy descendido se reduce la afinidad del Ca^{2+} por la bomba (Nakamura y cols., 2002). Un aumento de la [ADP] de 10 μ M a 0,2 mM causa una pequeña reducción de la actividad de las bombas de Ca^{2+} e induce un aumento al doble de las pérdidas de Ca^{2+} desde el RS a través del “slippage” de la bomba (MacDonald y Stephenson, 2001). El efecto del aumento de ADP en la [Ca^{2+}] del RS se ve ilustrado en la figura 4 (ver anexo). El aumento de las pérdidas de Ca^{2+} fue observada incluso en presencia de 5 – 8 mM de ATP si la PCr está descendida, indicando que la [ADP] cercana a las bombas es pobremente controlada si la PCr está descendida (Duke y Steele, 2001).

En resumen, la [ATP] y la [PCr] descendidas pueden reducir el bombeo de Ca^{2+} del retículo y aumentar las pérdidas a través de las bombas, resultando en una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevada como se ve típicamente en la fatiga.

La liberación de Ca^{2+} desde el RS a través del canal de Ca^{2+} RyR1 es estimulada fuertemente por la unión de ATP al sitio regulador; ADP y AMP actúan como agonistas competitivos, no así el IMP. Dicha liberación de Ca^{2+} es fuertemente inhibida por Mg^{2+} citoplasmático (Meissner y cols., 1986). La liberación inducida por el sensor de voltaje desciende aproximadamente un 40% al aumentar la $[\text{Mg}^{2+}]$ de 1 a 3 mM. La misma desciende un 20% al bajar la [ATP] a 0,5 mM. La reducción de la liberación de Ca^{2+} es mayor cuando se combina el aumento de la $[\text{Mg}^{2+}]$ y la disminución de la [ATP] (Dutka y Lamb, 2004) y mayor aún cuando los productos de la hidrólisis de ATP como adenosina o AMP están presentes (Blazey y cols., 1999).

Como conclusión, en el ejercicio intenso la tríada juega un papel central sensando la depleción de la [ATP] y responde reduciendo la liberación de Ca^{2+} . Esto desciende el uso de ATP bajando el ciclo de puentes cruzados y la recaptación de Ca^{2+} del retículo, dos fuentes principales de hidrólisis de ATP. El costo de esto es la reducción de la potencia, en otras palabras de la fatiga muscular. El beneficio es prevenir el agotamiento total de todo el ATP celular y consecuentemente el daño celular que conllevaría.

Glucógeno. En el músculo esquelético la glucosa es almacenada como glucógeno, que es la mayor fuente de energía durante la mayoría de las actividades musculares. Hay una correlación demostrada de la depleción de glucógeno y el tiempo que demora un músculo en fatigarse durante ejercicio moderadamente intenso (Hermansen y cols., 1967). La conexión entre el consumo de glucógeno y la disminución de la fuerza durante la fatiga no se ha podido entender.

Especies reactivas de O_2 (EROS). Las EROS son producidas en músculos activos y está establecido en la literatura que cumplen un rol en la fatiga muscular (Clanton y cols., 1999; Reid, 2001). La evidencia más clara es que se logra reducir la tasa de fatiga en experimentos en los que se utilizan antioxidantes exógenos. De todas formas no está claro la principal fuente de

las EROS, cual ERO en particular tiene mayor efecto en la fatiga, ni tampoco el mecanismo por el cuál las EROS contribuyen a la misma.

Las EROS más importantes son el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilados (OH). El O_2^- es producido en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa y también por enzimas como la NADPH oxidasa, xantina oxidasa y lipooxigenasa (Turrens, 2003). El O_2^- es moderadamente reactivo y rápidamente convertido por varias superóxido dismutasas en H_2O_2 . El H_2O_2 no es muy reactivo pero puede difundir a través de la membrana celular y puede tener un papel en la señalización además de oxidar algunas proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1998). El H_2O_2 puede ser degradado por varias vías. Una de ellas tiene gran importancia y es la reacción con metales libres como el Fe^{2+} , lo que produce OH que es extremadamente reactivo. Los OH tienen una vida media corta ya que pueden reaccionar virtualmente con cualquier molécula orgánica y puede dañar proteínas, ADN y lípidos. Dado que las EROS forman una cascada de reacciones desde el O_2^- al H_2O_2 hasta llegar al OH, es difícil establecer cual ERO tiene más importancia en el proceso de la fatiga.

La producción de EROS es acelerada durante la actividad muscular. Se ha establecido un aumento en la producción extracelular de O_2^- . No se sabe si dicho aumento es por salida de O_2^- a través de canales aniónicos de la célula o por la producción extracelular del mismo (Kolbeck y cols., 1997; Stofan y cols., 2000).

Como se estableció anteriormente, no está claramente definida la principal fuente de las EROS durante la actividad muscular. Se cree que la producción mitocondrial (Gong y cols, 2006) y la acción de la NADPH oxidasa (Xia y cols., 2003; Hidalgo y cols., 2006) son los mecanismos más relevantes.

Los antioxidantes han demostrado disminuir la producción de EROS durante la actividad muscular. La inyección intravenosa de n-acetil-cisteína (NAC) incrementó la fuerza de un 45% a un 66% al final de un período de estimulación intermitente de 20 Hz. La mejoría generada por el NAC se presentó tanto en las estimulaciones de baja frecuencia como las de alta frecuencia. Sin embargo, NAC no pareció mejorar la recuperación de la fatiga. La magnitud de la mejoría producida por los antioxidantes difiere en los

distintos estudios. Dos factores que contribuyen a esta diferencia son: la frecuencia de estimulación (Reid y cols., 1994) y la temperatura (Moopanar y Allen, 2005).

En estudios recientes se vio que el NAC minimizaba la reducción de la actividad de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que usualmente ocurre en el ejercicio (Sandiford y cols., 2005), y también atenuó la elevación del K^+ plasmático. Los autores proponen que los cambios iónicos asociados a la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ contribuyen a la fatiga, y estos pueden ser atenuados por los antioxidantes NAC (Glynn y cols., 1963).

En suma, está claro que las EROS son generadas en músculos activos y contribuyen al proceso de fatiga. Como las EROS son producidas y cuáles EROS son importantes permanece incierto. Muchos mecanismos de acción son posibles dado la susceptibilidad de las proteínas al daño oxidativo, pero la evidencia actual propone a las proteínas contráctiles y a las bombas de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ como los sitios de mayor afección por las EROS en condiciones fisiológicas.

Conclusiones finales. La fatiga se produce por múltiples mecanismos que varían en su importancia según la actividad física que se realice. En lo que refiere a las contracciones tetánicas de baja frecuencia en humanos, la fatiga ocasionada puede llevar a una reducción de la fuerza en un 50%. De esta disminución del 50%, un componente inicial del 10% (fase 1) posiblemente sea debido al aumento del Pi. El otro 40% se le puede atribuir a cambios en la activación. Estos incluyen aquellos que disminuyen la sensibilidad miofibrilar al Ca^{2+} y aquellos que reducen la liberación del Ca^{2+} por parte del RS. La disminución de la sensibilidad miofibrilar al Ca^{2+} podría ser explicada por el aumento del Pi y por las EROS. Por otra parte, la reducción de la liberación del Ca^{2+} se debería a la precipitación de $\text{Ca}^{2+}\text{-Pi}$ en el RS. En lo que respecta al fracaso del PA en la superficie o en la membrana tubular T, parecería que tendría poca influencia en la disminución de la liberación de Ca^{2+} en este tipo de contracciones. Por lo tanto no representaría un mecanismo determinante en la fatiga muscular en contracciones tetánicas de baja frecuencia.

Anexo

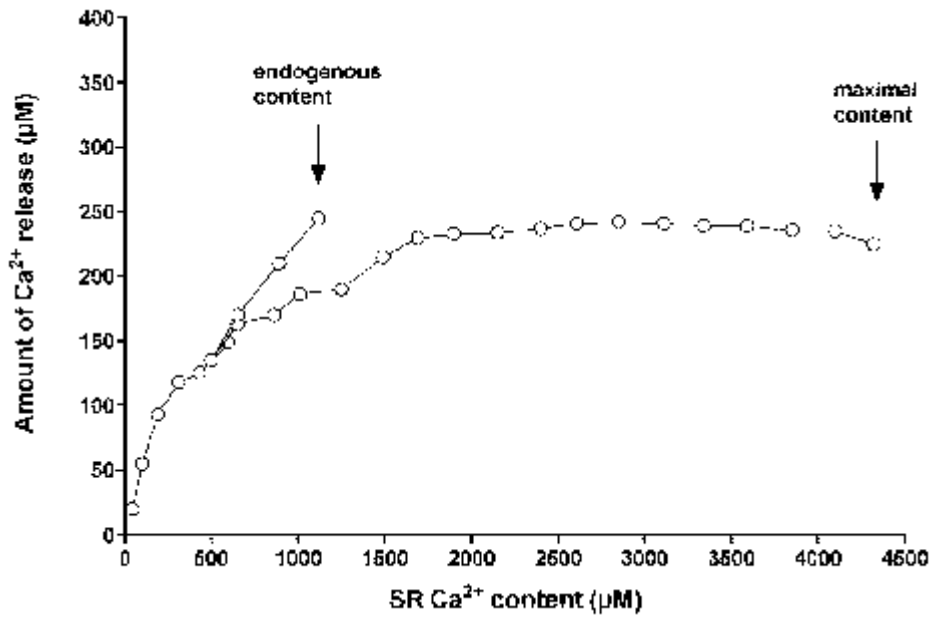


Figura 1 extraída Posterino y Lamb, 2003

Se muestra la cantidad de Ca²⁺ liberado por un estímulo de un solo potencial de acción versus el contenido de Ca²⁺ en el RS de una fibra pelada de músculo de rata. La cantidad de Ca²⁺ liberada por cada potencial de acción no cambio cuando se incrementó el contenido endógeno de Ca²⁺ del RS. Por otra parte hubo un descenso de la liberación de Ca²⁺ cuando se redujo el contenido de Ca²⁺ (por

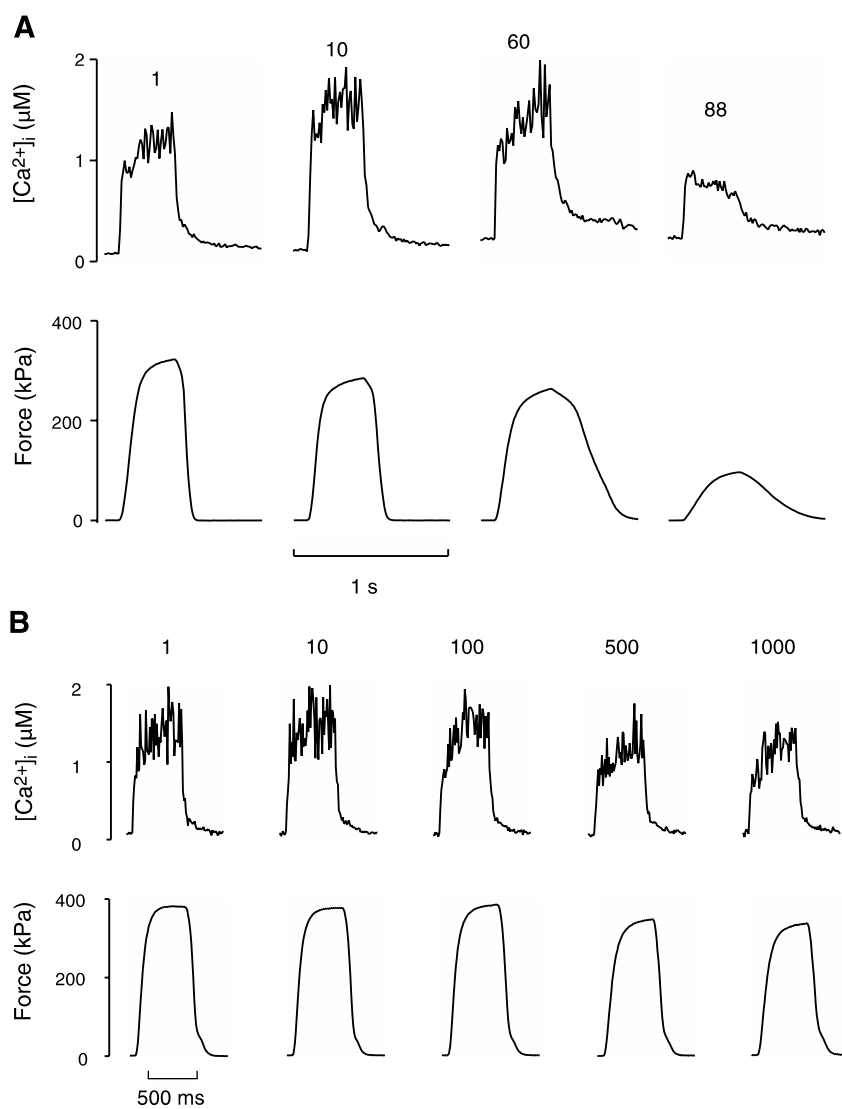


Fig 2. $[Ca^{2+}]$ intracelular y fuerzas obtenidas durante varias fases de la fatiga en fibras rápidas (A) y en fibras lentas (B). Los números encima de los gráficos indican el numero de tétanos. En la figura A se ven las 3 fases de la fatiga:

-fase 1: tétanos del 1 al 10

-fase 2: tétanos del 10 al 60

-fase 3: tétanos del 60 al 88

A) Extraıda de Dahlstedt y cols. (2000)

B) Extraıda de Bruton y cols. (2003)

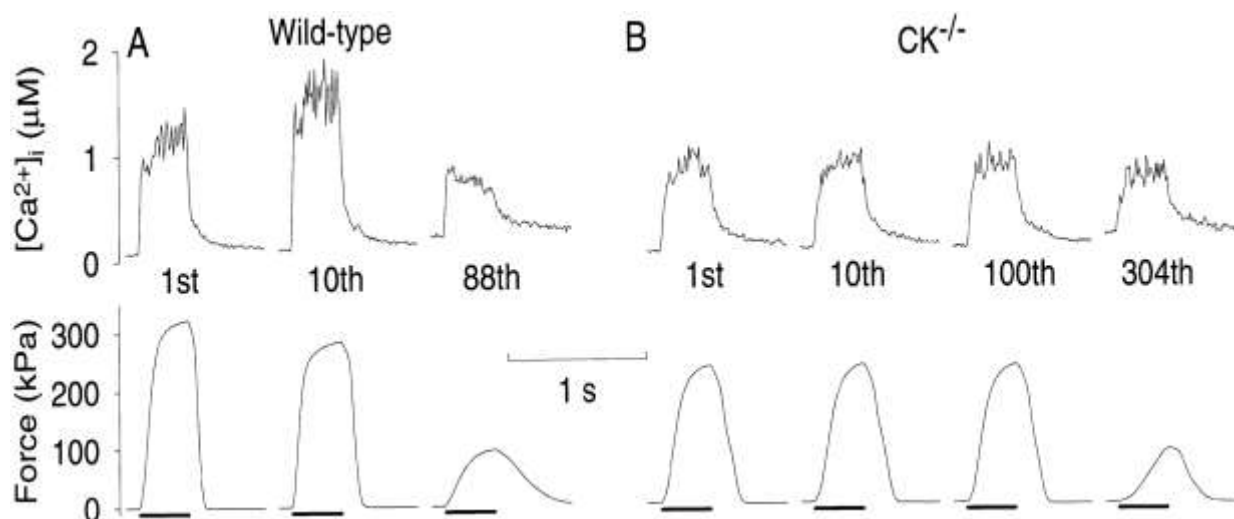


Fig. 3 . Extraída de Dahlstedt y cols., 2000. En el panel A se muestra la $[Ca^{2+}]_i$ intracelular y la fuerza en una fibra muscular normal durante una estimulación de baja intensidad. Los números debajo corresponden al número de tétanos (1, 10 y 88). En el panel B se muestra la $[Ca^{2+}]_i$ intracelular y la fuerza en una fibra muscular $CK^{-/-}$ durante una estimulación de baja intensidad. Los números debajo corresponden al número de tétanos (1, 10, 100 y 304).

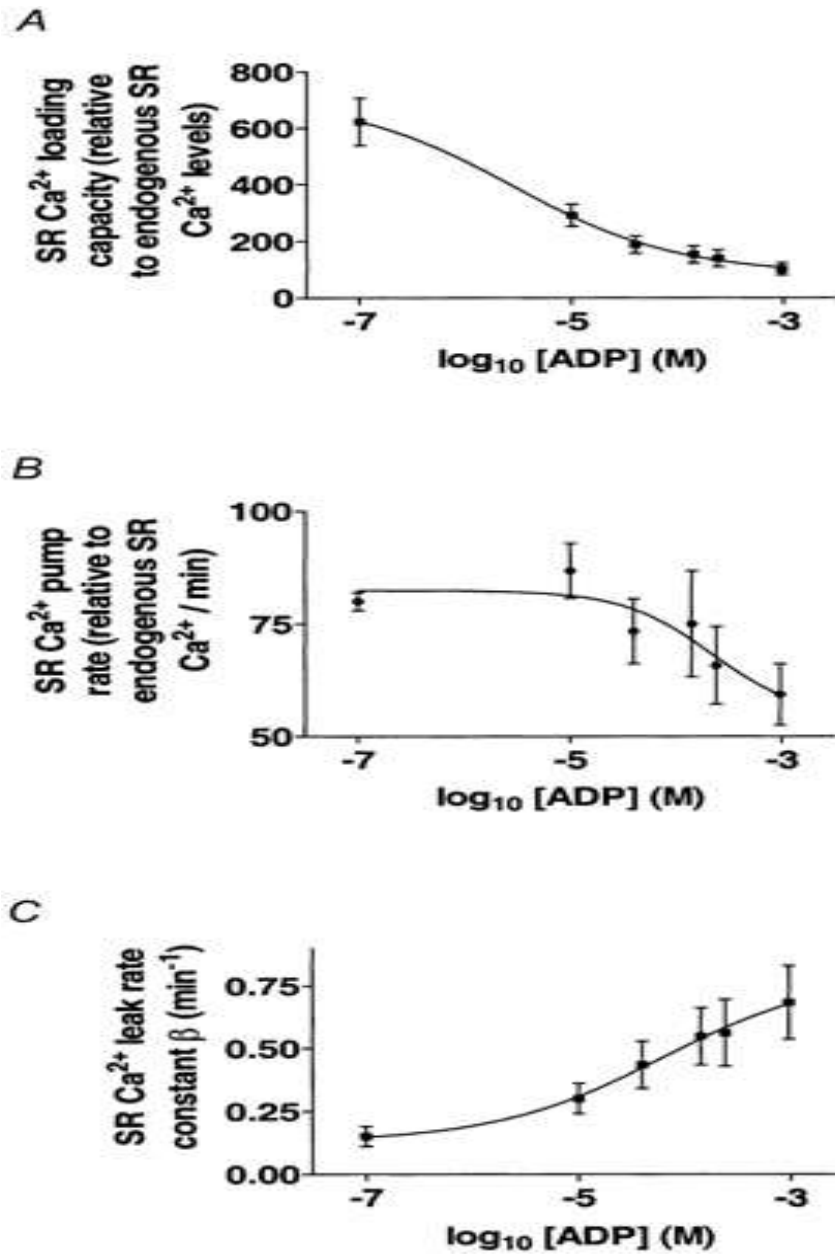


Fig. 4 A, Capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} del RS; B, Actividad de la bomba de Ca^{2+} del RS; C, Pérdidas de Ca^{2+} del RS.

Extraído de MacDonald y Stephenson. (2001).

Bibliografía

Adrian RH, Chandler WK, Rakowski RF. Charge movement and mechanical repriming in skeletal muscle. *J Physiol* 254: 361–388, 1976.

Allen D.G, Lamb G.D, Westerblad H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiol Rev* 88:287-332, 2008.

Allen DG, Lannergren J, Westerblad H. Muscle cell during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. *Exp Physiol* 80: 497–527, 1995.

Balog EM, Fitts RH. Effects of fatiguing stimulation on intracellular Na⁺ and K⁺ in frog skeletal muscle. *J Appl Physiol* 81:679–685, 1996.

Barcroft H, Millen JL. The blood flow through muscle during sustained contraction. *J Physiol* 97: 17–31, 1939.

Baylor SM, Hollingworth S. Sarcoplasmic reticulum calcium release compared in slow-twitch and fast-twitch fibres of mouse muscle. *J Physiol* 551: 125–138, 2003.

Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 85: 33–69, 2004.

Beltman JG, Van Der Vliet MR, Sargeant AJ, De Haan A. Metabolic cost of lengthening, isometric and shortening contractions in maximally stimulated rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 182: 179 –187, 2004.

Berchtold MW Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80: 1215–1265, 2000.

Bezanilla F, Caputo C, Gonzalez-Serratos H, Venosa RA. Sodium dependence of the inward spread of activation in isolated twitch muscles of the frog. *J Physiol* 223: 507–523, 1972.

Bigland-Ritchie B, Jones DA, Woods JJ. Excitation frequency and muscle fatigue: electrical responses during human voluntary and stimulated contractions. *Exp Neurol* 64: 414–427, 1979.

Bortolotto SK, Cellini M, Stephenson DG, Stephenson GM. MHC isoform composition and Ca^{2+} - or Sr^{2+} -activation properties of rat skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1564–C1577, 2000.

Bottinelli R, Reggiani C. Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* 73: 195–262, 2000.

Bruton J, Tavi P, Aydin J, Westerblad H, Lannergren J. Mitochondrial and myoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ in single fibres from mouse limb muscles during repeated tetanic contractions. *J Physiol* 551: 179–190, 2003.

Bruton JD, Lannergren J, Westerblad H. Effects of CO_2 -induced acidification on the fatigue resistance of single mouse muscle fibers at 28 degrees C. *J Appl Physiol* 85: 478–483, 1998.

Cady EB, Jones DA, Lynn J, Newham DJ. Changes in force and intracellular metabolites during fatigue of human skeletal muscle. *J Physiol* 418: 311–325, 1989.

Cairns SP, Buller SJ, Loiselle DS, Renaud JM. Changes of action potentials and force at lowered $[\text{Na}]_o$ in mouse skeletal muscle: implications for fatigue. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C1131–C1141, 2003.

Clausen T. Na^{2+} - K^+ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol Rev* 83: 1269–1324, 2003.

Dahlstedt AJ, Katz A, Tavi P, Westerblad H. Creatine kinase injection restores contractile function in creatine-kinase-deficient mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 547: 395–403, 2003.

Dahlstedt AJ, Katz A, Westerblad H. Role of myoplasmic phosphate in contractile function of skeletal muscle studies on creatine kinase deficient mice. *J Physiol* 533: 379–388, 2001.

Dahlstedt AJ, Katz A, Wieringa B, Westerblad H. Is creatine kinase responsible for fatigue? Studies of isolated skeletal muscle deficient in creatine kinase. *FASEB J* 14: 982–990, 2000.

Dawson MJ, Gadian DG, Wilkie DR. Mechanical relaxation rate and metabolism studied in fatiguing muscle by phosphorus nuclear magnetic

resonance. *J Physiol* 299: 465–484, 1980.

Delbono O, Meissner G. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in rat slow- and fast-twitch muscles. *J Membr Biol* 151: 123–130, 1996.

Duke AM, Steele DS. Interdependent effects of inorganic phosphate and creatine phosphate on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulation in mechanically skinned rat skeletal muscle. *J Physiol* 531: 729–742, 2001.

Dulhunty AF. Heterogeneity of T-tubule geometry in vertebrate skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 5: 333–347, 1984.

Dulhunty AF. The voltage-activation of contraction in skeletal muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 57: 181–223, 1992.

Dutka TL, Cole L, Lamb GD. Calcium phosphate precipitation in the sarcoplasmic reticulum reduces action potential-mediated Ca^{2+} release in mammalian skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1502–C1512, 2005.

Dutka TL, Lamb GD. Effect of lactate on depolarization-induced Ca^{2+} release in mechanically skinned skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C517–C525, 2000.

Dutka TL, Lamb GD. Effect of low cytoplasmic [ATP] on excitation-contraction coupling in fast-twitch muscle fibres of the rat. *J Physiol* 560: 451–468, 2004.

Dutka TL, Lamb GD. Transverse tubular system depolarization reduces tetanic force in rat skeletal muscle fibers by impairing action potential repriming. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C2112–C2121, 2007.

Edwards RHT, Hill DK, Jones DA, Merton PA. Fatigue of long duration in human skeletal muscle after exercise. *J Physiol* 272:769–778, 1977.

Edwards RHT, Hill DK, Jones DA. Metabolic changes associated with the slowing of relaxation in fatigued mouse muscle. *J Physiol* 251: 287–301, 1975.

Fabiato A, Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 276: 233–255, 1978.

Filatov GN, Pinter MJ, Rich MM. Resting potential-dependent regulation of the voltage sensitivity of sodium channel gating in ratskeletal muscle in vivo. *J Gen Physiol* 126: 161–172, 2005.

Fitts RH. Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev* 74: 49–94, 1994.

Fryer MW, Stephenson DG. Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol* 493: 357–370, 1996.

Gissel H, Clausen T. Excitation induced Ca^{2+} uptake in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R331–R339, 1999.

Gong MC, Arbogast S, Guo Z, Mathenia J, Su W, Reid MB. Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J Appl Physiol* 100: 399–405, 2006.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford Univ. Press, 1998.

Hermansen L, Hultman E, Saltin B. Muscle glycogen during prolonged severe exercise. *Acta Physiol Scand* 71: 129–139, 1967.

Hidalgo C, Sanchez G, Barrientos G, Aracena-Parks P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor Type 1 S-Glutathionylation. *J Biol Chem* 281: 26473–26482, 2006.

Hill CA, Harris RC, Kim HJ, Harris BD, Sale C, Boobis LH, Kim CK, Wise JA. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity. *Amino Acids* 32: 225–233, 2007.

Hogan MC, Gladden LB, Kurdak SS, Poole DC. Increased [lactate] in working dog muscle reduces tension development independent of pH. *Med Sci Sports Exercise* 27: 371–377, 1995.

Jaimovich E, Venosa RA, Shrager P, Horowicz P. Density and distribution of tetrodotoxin receptors in normal and detubulated frog sartorius muscle. *J Gen Physiol* 67: 399–416, 1976.

Jones DA, Bigland-Ritchie B, Edwards RHT. Excitation frequency and muscle fatigue: mechanical responses during voluntary and stimulated contractions. *Exp Neurol* 64: 414–427, 1979.

Juel C. Potassium and sodium shifts during in vitro isometric muscle contraction, the time course of the ion-gradient recovery. *Pflugers Arch* 406: 458–463, 1986.

Jurkat-Rott K, Fauler M, Lehmann-Horn F. Ion channels and ion transporters of the transverse tubular system of skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 27: 275–290, 2006.

Karatzafieri C, De Haan A, Ferguson RA, Van Mechelen W, Sargeant AJ. Phosphocreatine and ATP content in human single muscle fibres before and after maximum dynamic exercise. *Pflugers Arch* 442: 467–474, 2001.

Karlsson J, Funderburk CF, Essen B, Lind AR. Constituents of human muscle in isometric fatigue. *J Appl Physiol* 38: 208–211, 1975.

Kolbeck RC, She ZW, Callahan LA, Nosek TM. Increased superoxide production during fatigue in the perfused rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 140–145, 1997.

Lannergren J, Westerblad H. Force and membrane potential during and after fatiguing, continuous high-frequency stimulation of single *Xenopus* muscle fibres. *Acta Physiol Scand* 128: 359–368, 1986.

Lamb GD, Recupero E, Stephenson DG. Effect of myoplasmic pH on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the toad. *J Physiol* 448: 211–224, 1992.

Lamb GD, Stephenson DG, Stienen GJ. Effects of osmolality and ionic strength on the mechanism of Ca^{2+} release in skinned skeletal muscle fibres of the toad. *J Physiol* 464: 629 – 648, 1993.

MacDonald WA, Stephenson DG. Effects of ADP on sarcoplasmic reticulum function in mechanically skinned skeletal muscle fibres of the rat. *J Physiol* 532: 499–508, 2001.

Madsen K, Ertbjerg P, Djurhuus MS, Pedersen PK. Calcium content and respiratory control index of skeletal muscle mitochondria during exercise and recovery. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 271: E1044–E1050, 1996.

Martyn DA, Gordon AM. Force and stiffness in glycerinated rabbit psoas fibers. Effects of calcium and elevated phosphate. *J Gen Physiol* 99: 795–816, 1992.

Meissner G, Darling E, Eveleth J. Kinetics of rapid Ca^{2+} release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , adenine nucleotides. *Biochemistry* 25: 236 –244, 1986.

Moopanar TR, Allen DG. Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca^{2+} -sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37°C. *J Physiol* 564: 189 –199, 2005.

Nakajima S, Nakajima Y, Peachey LD. Speed of repolarization and morphology of glycerol-treated frog muscle fibres. *J Physiol* 234: 465–480, 1973.

Nakamura J, Tajima G, Sato C, Furukohri T, Konishi K. Substrate regulation of calcium binding in Ca^{2+} -ATPase molecules of the sarcoplasmic reticulum. I. Effect of ATP. *J Biol Chem* 277: 24180–24190, 2002.

Nielsen JJ, Mohr M, Klarskov C, Kristensen M, Krstrup P, Juel C, Bangsbo J. Effects of high-intensity intermittent training on potassium kinetics and performance in human skeletal muscle. *J Physiol* 554: 857–870, 2004.

Nielsen OB, De Paoli F, Overgaard K. Protective effects of lactic acid on force production in rat skeletal muscle. *J Physiol* 536: 161–166, 2001.

Overgaard K, Fredsted A, Hyldal A, Ingemann-Hansen T, Gissel H, Clausen T. Effects of running distance and training on Ca^{2+} content and damage in human muscle. *Med Sci Sports Exercise* 36:821–829, 2004.

Pate E, Cooke R. Addition of phosphate to active muscle fibers probes actomyosin states within the powerstroke. *Pflugers Arch* 414: 73–81, 1989.

Pedersen TH, De Paoli F, Nielsen OB. Increased excitability of acidified skeletal muscle: role of chloride conductance. *J Gen Physiol* 125: 237–246, 2005.

Posterino GS, Dutka TL, Lamb GD. L(+)-Lactate does not affect twitch and tetanic responses in mechanically skinned mammalian muscle fibres. *Pflugers Arch* 442: 197–203, 2001.

Posterino GS, Lamb GD. Effect of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content on action potential-induced Ca^{2+} release in rat skeletal muscle fibres. *J Physiol* 551: 219–237, 2003. *Physiol* 289: C1502–C1512, 2003.

Reid MB. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90: 724–731, 2001.

Reid MB, Stokic DS, Koch SM, Khawli FA, Leis AA. N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest* 94: 2468–2474, 1994.

Rich MM, Pinter MJ. Crucial role of sodium channel fast inactivation in muscle fibre in excitability in a rat model of critical illness myopathy. *J Physiol* 547: 555–566, 2003.

Richardson RS, Duteil S, Wary C, Wray DW, Hoff J, Carlier PG. Human skeletal muscle intracellular oxygenation: the impact of ambient oxygen availability. *J Physiol* 571: 415–424, 2006.

Richardson RS, Noyszewski EA, Kendrick KF, Leigh JS, Wagner PD. Myoglobin O₂ desaturation during exercise Evidence of limited O₂ transport. *J Clin Invest* 96: 1916–1926, 1995.

Rios E, Pizarro G. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev* 71: 849–908, 1991.

Ruff RL. Na current density at and away from end plates on rat fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 262: C229–C234, 1992.

Ruff RL. Single-channel basis of slow inactivation of Na²⁺ channels in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C971–C981, 1996.

Sahlin K, Ren JM. Relationship of contraction capacity to metabolic changes during recovery from a fatiguing contraction. *J Appl Physiol* 67: 648 – 654, 1989.

Sandiford SD, Green HJ, Duhamel TA, Schertzer JD, Perco JD, Ouyang J. Muscle Na-K-pump and fatigue responses to progressive exercise in normoxia and hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R441–R449, 2005.

Sjøgaard G, Adams RP, Saltin B. Water and ion shifts in skeletal muscle of humans with intense dynamic knee extension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 248: R190–R196, 1985.

Sostaric SM, Skinner SL, Brown MJ, Sangkabutra T, Medved I, Medley T, Selig SE, Fairweather I, Rutar D, McKenna MJ. Alkalosis increases muscle K⁺ release, but lowers plasma [K⁺] and delays fatigue during dynamic forearm exercise. *J Physiol* 570: 185–205, 2006.

Spriet LL, Matsos CG, Peters SJ, Heigenhauser GJ, Jones NL. Effects of acidosis on rat muscle metabolism and performance during heavy exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 248: C337–C347, 1985.

Stary CM, Hogan MC. Intracellular pH during sequential, fatiguing contractile periods in isolated single *Xenopus* skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 99: 308–312, 2005.

Stephenson DG. Tubular system excitability: an essential component of excitation– contraction coupling in fast twitch fibres of vertebrate skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 27: 259–274, 2006.

Stofan DA, Callahan LA, Dimarco AF, Nethery DE, Supinski GS. Modulation of release of reactive oxygen species by the contracting diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 891–898, 2000.

Sutton JR. Limitations to maximal oxygen uptake. *Sports Med* 13:127–133, 1992.

Takagi Y, Shuman H, Goldman YE. Coupling between phosphate release and force generation in muscle actomyosin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 1913–1920, 2004.

Thompson LV, Balog EM, Riley DA, Fitts RH. Muscle fatigue in frog semitendinosus: alterations in contractile function. *Am J Physiol Cell Physiol* 262: C1500–C1506, 1992.

Trinh HH, Lamb GD. Matching of sarcoplasmic reticulum and contractile properties in rat fast- and slow-twitch muscle fibres. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 591–600, 2006.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335–344, 2003.

West W, Hicks A, Mckelvie R, O'Brien J. The relationship between plasma potassium, muscle membrane excitability and force following quadriceps fatigue. *Pflugers Arch* 432: 43–49, 1996.

Westerblad H, Allen DG. Myoplasmic free Mg^{2+} Concentration during repetitive stimulation of single fibres from mouse skeletal muscle. *J Physiol* 453: 413–434, 1992.

Westerblad H, Lee JA, Lamb AG, Bolsover SR, Allen DG. Spatial gradients of intracellular calcium in skeletal muscle during fatigue. *Pflugers Arch* 415: 734–740, 1990.

Williams JH, Ward CW. Reduced Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum at low pH. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 926 – 930, 1992.

Xia R, Webb JA, Gnall LL, Cutler K, Abramson JJ. Skeletal muscle sarcoplasmic reticulum contains a NADH-dependent oxidase that generates superoxide. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C215–C221, 2003.

Zhao X, Yoshida M, Brotto L, Takeshima H, Weisleder N, Hirata Y, Nosek TM, Ma J, Brotto M. Enhanced resistance to fatigue and altered calcium handling properties of sarcalumen in knockout mice. *Physiol Gen* 23: 72–78, 2005.