

Revisão

Bases metabólicas da rabdomiólise e atrofia muscular

Metabolic basis of rhabdomyolysis and muscle atrophy

Rodrigo Minoru Manda*, Fernando Moreto**, Roberto Carlos Burini, D.Sc.***

*Biomédico, Centro de metabolismo em exercício e nutrição (CeMENutri), Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), Programa Laboratório em Metabolismo Nutricional e Desportivo, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), ** Biomédico, Centro de metabolismo em exercício e nutrição (CeMENutri), Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), *** Professor Titular do Departamento de Saúde Pública da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e responsável pelo CeMENutri, Departamento de Saúde Pública, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP)

Resumo

A redução da musculatura esquelética ou atrofia muscular ocorre gradativamente a partir dos 30 anos de idade, mas com significância importante a partir da 5ª década. Entretanto, ocorre em qualquer idade, na privação alimentar de carboidratos e no trauma. Pode ocorrer por denervação, desuso, deficiência nutricional, desequilíbrio hormonal e inflamação. A proteólise muscular ocorre predominantemente via ATP-ubiquitina-proteossoma e cooperativamente com os sistemas calpaína e caspase 3. Como promotores da proteólise figuram os glicocorticóides, o FOXO3 e as citocinas pró-inflamatórias. O TNF α , ativa o NF- κ B tanto pelo Ca⁺⁺ intracelular como pelas espécies reativas do oxigênio. Figuram como marcadores moleculares da atrofia muscular, a expressão aumentada dos genes MAFbx/atrogina 1 e MURF-1 e os marcadores proteolíticos como ubiquitina, calpaína, miostatina, TNF α e NF- κ B. No geral, a rabdomiólise tem o estresse oxidativo como principal efetor e a disfunção mitocondrial, apoptose celular, como desfecho.

Palavras-chave: rabdomiólise, proteólise, atrofia muscular, caquexia.

Abstract

A gradual reduction in muscle mass began to occur physiologically after 30 years of age achieving clinical importance beyond the 5th decade of life. However it can occur earlier by the presence of food-energy deprivation and/or in association with trauma. Skeletal-muscle loss may occur by causes such as muscle denervation, disuse, nutritional deficiencies, hormonal imbalance and inflammation states. Muscle proteolysis occurs predominantly through ATP-ubiquitin-proteasomal pathway, cooperatively with systems of calpain and caspase 3. As proteolytic promoters there are the glucocorticoids, FOXO3 and the pro-inflammatory cytokines. TNF α activates NF κ B either by increasing Ca⁺⁺ intracellular as well by the increased reactive oxygen species. The over expression of genes MAFbx/atrogen 1 and MURF-1 are the main molecular markers of muscular atrophy whereas ubiquitin, calpain, TNF α and NF κ B figure as the proteolytic markers. In general, oxidative stress is the main promoter of rhabdomyolysis and both mitochondrial dysfunction and cellular apoptosis are the outcomes.

Key-words: rhabdomyolysis, proteolysis, muscle atrophy, cachexia.

Recebido 15 de janeiro de 2010; aceito 15 de abril de 2010.

Endereço para correspondência: Roberto Carlos Burini, CeMENutri, Faculdade de Medicina, Departamento de Saúde Pública (FMB-UNESP), Distrito de Rubião Jr, s/nº 18618-970 Botucatu SP, Tel: (14) 3811-6128, E-mail: burini@fmb.unesp.br, rodrigo_manda@yahoo.com.br

Introdução

A musculatura esquelética constitui o maior tecido do corpo. Sua redução significativa está associada a patologias metabólicas como diabetes melito tipo 2 (DM-2), obesidade, dificuldades de cicatrização e imunodepressão [1]. Adicionalmente, por estar ligada aos maiores compartimentos colágeno e mineral do corpo, tem implicações importantes na densidade mineral óssea e função osteoarticular. Como consequência da menor aptidão física, há comprometimento do equilíbrio com quedas, fraturas e maior mortalidade [2,3].

Na vida adulta a perda muscular ocorre quantitativamente por atrofia sarcoplasmática, mais precisamente por proteólise miofibrilar [4].

A massa muscular é mantida pelo balanço entre a síntese e o catabolismo protéico miofibrilar, entre os processos de apoptose e regeneração ou ambos. O catabolismo protéico é o principal determinante da deposição protéica muscular adulta [5]. Assim, o processo de perda de massa ou atrofia muscular é decorrente do predomínio do catabolismo sobre a síntese de suas proteínas [6].

A atrofia é acompanhada pela redução do tamanho (diâmetro) e número das miofibrilas e o determinante do diâmetro da fibra parece ser a densidade de mionúcleos, que guardariam proporção com o sarcoplasma e este com as miofibrilas. Proporção análoga existiria entre a rede vascular (e perfusão) muscular e as miofibrilas.

Causas da atrofia muscular

A atrofia muscular esquelética pode ocorrer por denervação, desuso, desnutrição, desequilíbrio hormonal ou inflamação [3].

A atrofia muscular por denervação pode ser observada nas condições de seccionamento de terminação nervosa local ou da medula espinal, assim como pela neurodegeneração patológica (Alzheimer, paralisia infantil) ou farmacológica [7].

A atrofia por desuso é vista nas situações de: imobilização de membros, ventilação mecânica (atrofia do diafragma), microgravidade (vôos espaciais prolongados), hospitalização longa (*bed rest*) e inatividade física cotidiana (sedentarismo) [8].

A atrofia por desnutrição ocorre por privação dietética de carboidratos e necessidade de preservar a homeostase glicêmica (pela neoglicogênese hepática) à custa de aminoácidos da proteólise muscular.

A atrofia por desequilíbrio hormonal está associada ao predomínio dos hormônios catabólicos do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal: hormônio adrenocorticotrófico, cortisol, tiroxina e catecolaminas; sobre os hormônios anabólicos sistêmicos: hormônio do crescimento (GH), testosterona, estrogênios, insulina e IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*). São exemplos deste tipo de atrofia o ocorrido na menopausa, hiperfunção adrenal ou corticoterapia prolongada e na senilidade [9-11].

De forma análoga, a atrofia inflamatória se caracteriza pelo predomínio das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF α) sobre as anti-inflamatórias (IL-2 e IL-10).

Quando persistido cronicamente, esse padrão citocínico (TNF α) retroalimentado positivamente pelo estresse oxidativo [12,13], leva a síndrome de caquexia, em que o desgaste muscular (com relativa preservação do tecido adiposo) é acompanhado de anorexia, anemia, hipoalbuminemia, dificuldade de cicatrização e imunodeficiência [1]. São exemplos de caquexia: a artrite reumatóide, o câncer e AIDS. Entretanto, não se exclui a participação inflamatória na hipotrofia muscular do alcoólatra, renal crônico e do obeso. As causas nutricionais e sedentarismo estão intimamente associadas [11,14].

Mecanismos proteolíticos

A degradação das proteínas musculares ocorre por quatro vias proteolíticas principais: a lisossômica [15], a proteossômica dependente da ubiquitina (Ub) [16], as proteases cálcio (Ca⁺⁺) dependentes (calpaínas I e II) e suas inibidoras (calpastatins), existentes no citosol e; por fim, o sistema que envolve a caspase 3, enzima citosólica participante também do processo de apoptose celular [8].

Proteólise lisossômica

Na proteólise lisossômica, as proteínas encaminhadas à organela são degradadas por proteases ácidas denominadas catépsinas. Diferentes vias são usadas para entregar substratos proteicos intracelulares aos lisossomos: microautofagia, crinofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia [15].

O músculo esquelético contém poucos lisossomos e esse sistema é, provavelmente, responsável pelo catabolismo, apenas, de algumas proteínas de vida longa, de proteínas membranosas ou ambas e pela eliminação de organelas. Os sistemas fomentadores de macroautofagia e autofagia mediada por chaperonas, que são pouco intensos em condições basais, são estimulados em condições de estresse como: jejum crônico, estresse oxidativo e exposição celular a compostos tóxicos [17].

Proteólise dependente da via ATP-ubiquitina-proteossoma

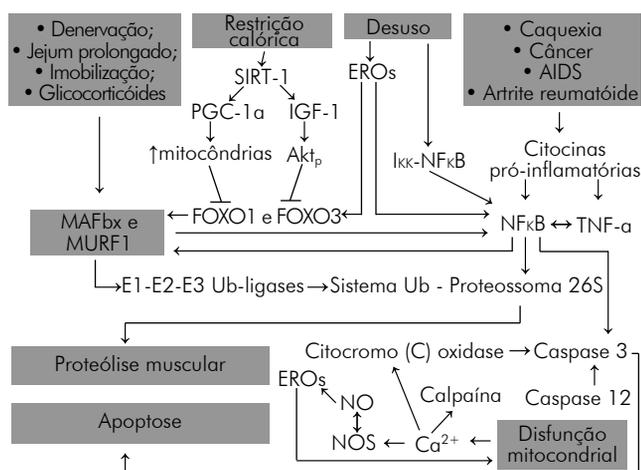
A proteólise proteossomal é dependente da ubiquitina (Ub), proteína norteadora da proteína a ser destruída. A via proteolítica ubiquitina-proteossoma constitui importante mecanismo no catabolismo proteico de células eucarióticas, sendo estimulado em situações de diminuição do trabalho muscular, denervação, tratamento com glicocorticóide (dexametasona), administração de IL-1, estresse inflamatório e câncer [18,19]. Essa via envolve, basicamente, duas etapas: a ligação covalente da ubiquitina ao substrato proteico a ser destruído e o catabolismo proteico por proteases do proteos-

soma 26S, estrutura em forma de tubo, dotada de proteases, em seu interior, responsáveis pela fragmentação da cadeia polipeptídica em peptídeos livres.

A ubiquitinação do substrato inicia-se com a ativação de pelo menos 3 classes de proteínas: E1, ativadora da Ub; E2, conjugadora da Ub e; E3, ligases da Ub. São responsáveis pela conjugação da Ub às proteínas intracelulares, que são reconhecidas e degradadas no proteossoma [20]. A E3 Ub-ligase, também, é conhecida como muscle ring finger (MuRF-1) e a muscle atrophy F-box (MAFbx/atrogina 1). MuRF-1 e MAFbx/atrogina 1 são genes que apresentam expressão elevada no músculo atrofico. A expressão proteica (E3 Ub-ligase) é responsável pela conjugação específica da ubiquitina ao substrato [18,21]. Paralelamente, há maior expressão do mRNA do proteossoma 26S (contendo as proteases) [16].

A transcrição dos genes reguladores da atrofia (MAFbx/atrogina 1 e MuRF-1) é regulada pelos fatores transcricionais da família FOXO (*fork head box O*): FOXO1 e FOXO3. A atividade desses fatores transcricionais é modulada pela serina/treonina quinase Akt. A fosforilação da Akt inibe a ação dos fatores FOXO e, conseqüentemente, a ativação dos genes da atrofia. Reciprocamente, a não-fosforilação da Akt permite a atividade dos fatores FOXO, promovendo a atrofia muscular, decorrente da maior expressão dos genes MAFbx/atrogina 1 e MuRF-1 [22](Figura 1).

Figura 1 - esquema da integração dos processos de apoptose e proteólise muscular.



SIRT-1: deacetilase sirtuina; PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ; IGF-1: insulin-like growth factor 1; Akt_p: serina/treonina quinase Akt fosforilada; FOXO1 e FOXO3: fork head Box O; EROs: espécies reativas de oxigênio; I κ B-NF κ B: fator nuclear κ B; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; MAFbx: muscle atrophy F-box; MURF-1: muscle ring finger; Sistema Ub-Proteossoma 26S: sistema ubiquitina proteossoma 26S; Ca²⁺: Cálcio; NOS: óxido nítrico sintase; NO: óxido nítrico.

O composto ubiquitinado dirige-se ao proteossoma e é reconhecido pela subunidade 8S, iniciando-se o desenove-

lamento da cadeia polipeptídica, permitindo assim a ação das proteases presentes na subunidade 20S, liberando os peptídeos livres.

Proteólise cálcio dependente

A atividade proteolítica dependente de cálcio é condicional a atividade de cisteína-proteases, conhecidas como calpaínas [23], e decorrente do predomínio das calpaínas sobre as calpastatinas, inibidoras endógenas da primeira. As isoformas bem caracterizadas da calpaína são calpaína 1 (ou μ -calpaína), calpaína 2 (ou m-calpaína) e calpaína 3 (ou p97), sendo esta músculo específica [24].

Variações na expressão dos níveis de calpaínas e de seus reguladores foram relatados na atrofia muscular induzida pelo desuso, no envelhecimento com ausência de exercício físico e no tratamento com dexametasona [21].

Similarmente às catepsinas, as calpaínas não são sistematicamente ativadas e, provavelmente, não são diretamente responsáveis pelo catabolismo de actina e miosina. Sugere-se, entretanto, que possam atuar na desagregação das proteínas sarcoméricas, passo inicial para degradação das proteínas miofibrilares pelo sistema proteossomal [25].

As calpaínas estão envolvidas em diferentes mecanismos celulares: proliferação, migração e fusão dos mioblastos, associados à regeneração muscular. Participam ainda na regulação da apoptose e proliferação das células satélites [26], células tronco musculares dotadas da capacidade de regeneração das fibras musculares submetidas a estímulos catabólicos (exercício excêntrico, ferimentos etc) [27].

Proteólise dependente das caspases

A caspase 3 é a protease que cataboliza proteínas musculares de estrutura complexa (ex: actina/miosina), tornando-as viáveis a serem degradadas completamente pelo sistema Ub-proteossoma [28].

As espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas no músculo tanto em repouso como no exercício, quando não neutralizadas, resultam em estado de estresse oxidativo, que podem levar a rhabdomiólise tanto pela proteólise via caspase 3, como pela apoptose via disfunção mitocondrial [6]. Ambas são decorrentes da maior concentração citosólica de Ca⁺⁺ (Figura 1).

A proteólise pela caspase 3 ocorre, tanto pelo aumento do Ca⁺⁺ intracelular, através da via: Ca⁺⁺ \rightarrow calpaína \rightarrow caspase 12 \rightarrow caspase 3, como pela citocromo oxidase, liberada em situações de agressão mitocondrial, pela via: calpaína \rightarrow BID \rightarrow tBID \rightarrow mitocôndria \rightarrow citocromo c \rightarrow caspase 3 [8].

Adicionalmente, o Ca⁺⁺ pode induzir a geração de EROs, tanto pela via: Ca⁺⁺ \rightarrow nNOS \rightarrow NO \rightarrow EROs, como pelos estágios mitocondriais 3 \rightarrow 4 \rightarrow EROs e também pelo transdutor do sarcolema PkC \rightarrow Erk 1/2 \rightarrow NAD(P)se \rightarrow EROs. As EROs podem ainda ser geradas, independentemente do Ca⁺⁺, via xantina oxidase [8].

Integração dos mecanismos proteolíticos

Citocinas pró-inflamatórias agem como estimuladores proteolíticos via ativação do NF- κ B, tanto por EROs como pela mobilização do Ca⁺⁺ do retículo sarcoplasmático [29] (figura 1). Nesse sentido, a rabdomiólise induzida pelo TNF α está associada as EROs e alterações de indicadores pró-antioxidantes como GSH/GSSG (glutathiona reduzida/oxidada).

EROs levam a ativação das vias sinalizadoras que ativam fatores de transcrição (NF- κ B, FOXO) [25] (Figura 1).

As enzimas de ubiquitinação (ligases) são reguladas por mecanismos S-tiolização/detiolização e, portanto, susceptíveis ao estresse oxidativo [30].

Assim, a atrofia muscular decorrente do TNF α está associada à ativação do NF- κ B com ligação ao sistema proteossomal [6], pela indução da E3 Ub-ligase (MuRF-1 e MAFbx/atrogina 1) [31] (Figura 1).

Embora seja aceito que o sistema ATP-Ub-proteossomal seja o predominante na proteólise muscular [32,33], foi demonstrado que o sistema proteossomal é capaz de degradar actina ou miosina isoladamente, mas não a miofibrila. Desta forma, as proteínas miofibrilares primeiro seriam liberadas pela proteólise da titina por calpaínas concentradas na linha Z. Assim, os estágios iniciais da rabdomiólise seriam dependentes das calpaínas e caspase 3 e os finais pelo sistema Ub-proteossomal [33,34].

Ativadores da proteólise muscular

Dentre os promotores a via proteolítica (Ub-proteossoma), encontra-se os fatores de transcrição (FOXO), sendo o estresse oxidativo o principal sinal “upstream” para a proteólise miofibrilar [8]. O principal alvo proteolítico do estresse oxidativo seria a ativação da caspase 3 adicional a disfunção mitocondrial e apoptose celular [6] (Figura 1).

A expressão aumentada dos genes da E3-Ub ligase muscular é vista na atrofia muscular das condições de jejum, diabetes, microgravidades, imobilização e deficiências de nutrientes [18,19,35]. Essa expressão pode ser estimulada pelo tratamento da célula muscular com TNF α via ativação da p38/MAPk [36]. Acredita-se que na atrofia induzida pelo desuso a expressão aumentada do MuRF-1 e MAFbx/atrogina 1, seja induzida pelo sinalizador I κ B-NF- κ B [37].

O TNF α é ativador potente do NF- κ B e há ligação entre TNF α -NF- κ B e o sistema proteolítico ubiquitina dependente [6] (figura 1). A inibição do NF κ B reduz a proteólise em cultura de células musculares [29], enquanto o tratamento crônico com TNF α resulta em perda de miosina [31]. As concentrações de TNF α ampliam a transcrição de NF- κ B, suprimindo o fator de diferenciação muscular MyoD e prejudicando o reparo muscular [38]. O TNF α induz a E3-Ub ligase, com consequente atrofia muscular e redução da força contrátil, em mecanismo semelhante ao da cardiomiopatia crônica [31].

Assim, figuram como marcadores moleculares da atrofia muscular a expressão aumentada dos genes MAFbx/atrogina-1 e MURF-1 [18,19]. Como mediadores proteolíticos incluem Ub, calpaína, miostatina, TNF α e NF- κ B [6].

No jejum e em patologias como câncer e insuficiência renal crônica, os glicocorticóides têm mostrado atividade “upstream”, aumentando a expressão da E3-Ub ligase e miostatina [39]. As citocinas pró-inflamatórias, particularmente o TNF α , agem como estimuladores, pela ativação do NF- κ B tanto pelo estresse oxidativo como pela mobilização do cálcio intracelular (e disfunção mitocondrial) (figura 1).

Distúrbios no balanço de oxi-redução são mecanismos regulatórios críticos na ativação de ambos, calpaínas e caspase 3, durante a atrofia do miotúbo [40]. Estresse oxidativo e inflamação são fortemente correlacionados e contribuem para os estados de atrofia muscular. Além desses, resistência insulínica e acidose metabólica também constituem estímulos rabdomiolíticos. A deficiência insulínica experimental resulta na hiperativação do sistema ATP-Ub-proteossoma pela expressão gênica [41]. A proteólise muscular induzida pela acidose é via ATP-Ub-proteossoma, mas requer as concentrações aumentadas de glicocorticóides decorrentes da acidose metabólica [42].

Nos exercícios exaustivos ou nos modelos de exercícios excêntricos, há danos musculares relatados em indivíduos saudáveis. São caracterizados por danos morfológicos e celulares, com vazamento de constituintes celulares para a circulação, resposta inflamatória, disfunção muscular e dor [43]. Nestas condições, há aumento dos mediadores proteolíticos (E3-Ub ligase, proteossoma 26S e calpaína) [44]. No dano muscular pelo exercício exaustivo há dor (sinal clínico), perda de força (sinal funcional) e elevação dos marcadores musculares no sangue (sinal bioquímico) [45].

Assim, tanto os processos miostáticos, como os rabdomiolíticos têm no estresse oxidativo seu principal efetor e a apoptose celular por disfunção mitocondrial seu desfecho. Como estímulos, há aumento do cálcio intracelular, atividade pró-inflamatória, elevação dos glicocorticóides, denervação e dano muscular por exercício exaustivo (Figura 1).

Ratos SOD -/- (superóxido dismutase) desenvolvem atrofia (redução do diâmetro das fibras e número de mio-núcleos) associadamente a maior proteólise e apoptose com maiores atividades das calpaínas, caspase 3 e endonuclease G (e fragmentação do DNA) [46]. Citocinas pró-inflamatórias (IL1, IL-6, IL-8 e TNF α) agem como mediadores proteolíticos “upstream” pela ativação do NF- κ B, o que é feito tanto pela mobilização do Ca⁺⁺ intracelular (das EROs) como pela produção de EROs [29].

A restrição calórica e o treinamento físico reduzem a produção de EROs e aumentam a defesa antioxidante, respectivamente, neutralizando o estresse oxidativo. As EROs são os principais processos ativadores da disfunção mitocondrial e rabdomiólise. A restrição calórica aumenta a biogênese mitocondrial (via PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α) e a sensibilidade insulínica (via

PI3K, phosphoinositide 3-kinase), ambos pela ativação da deacetilase sirruína (SIRT1) (figura 1).

Em animais SOD^{-/-} a restrição calórica reduz a geração de EROs, aumenta a sobrevivência, reverte os efeitos da denervação e a intolerância dos animais ao exercício físico [46].

Conclusão

Em conclusão, pode-se afirmar que a rabdomiólise tem, de forma geral, o estresse oxidativo como principal efator. Por outro lado, a disfunção mitocondrial com apoptose celular parece consistir em seu principal desfecho.

Referências

- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor in the malnutrition (cachexia) of infection and cancer. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:2-7.
- Pereira SEM, Buksman S, Perracini M, Py L, Barreto KML, Leite VMM. Queda em idosos. *Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia*; 2001. [citado 2010 mai 13]. Disponível em URL: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/082.pdf
- Roubenoff R. Sarcopenia: a major modifiable cause of frailty in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2000;4:140-2.
- Dirks AJ, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in age-related skeletal muscle atrophy. *Sports Med* 2005;35:473-83.
- Combaret L, Dardevet D, Bechet D, Taillandier D, Mosoni L, Attaix D. Skeletal muscle proteolysis in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:37-41.
- Wismann JA, Willoughby DS. Effects of protein/amino acid supplementation and gastrocnemius immobilization on muscle mass, strength, and gene expression. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S474.
- Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *Faseb J* 2007;21:140-155.
- French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, Powers SK. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *Faseb J* 2008;22:2862-71.
- Barbieri M, Ferrucci L, Ragno E, Corsi A, Bandinelli S, Bonafè M et al. Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E481-7.
- Volpi E, Nazemi R, Fujita S. Muscle tissue changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:405-10.
- Morley JE, Thomas DR, Wilson MM. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr* 2006;83:735-43.
- Costelli P, Carbo N, Tessitore L, Bagby GJ, Lopez-Soriano FJ, Argilés JM, et al. Tumor necrosis factor- α mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J Clin Invest* 1993;92:2783-9.
- Wing SS, Goldberg AL. Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting. *Am J Physiol* 1993;264:E668-76.
- Roubenoff R, Roubenoff RA, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawson-Hughes B et al. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest* 1994;93:2379-86.
- Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:2098-114.
- Kandarian SC, Stevenson EJ. Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exerc Sport Sci Rev* 2002;30:111-6.
- Kiffin R, Kaushik S, Zeng M, Bandyopadhyay U, Zhang C, Massey AC et al. Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age. *J Cell Sci* 2007;120:782-91.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai UK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704-8.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14440-5.
- Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* 1996;335:1897-905.
- Stevenson EJ, Giresi PG, Koncarevic A, Kandarian SC. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2003;551:33-48.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Shurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004;117:399-412.
- Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino FM. Ca(2+)-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:2134-46.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev* 2003;83:731-801.
- Attaix D, Ventadour S, Codran A, Bechet D, Taillandier D, Combaret L. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem* 2005;41:173-86.
- Dargelos E, Poussard S, Brule C, Daurly L, Cottin P. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie* 2008;90:359-68.
- Nair KS. Aging muscle. *Am J Clin Nutr* 2005;81:953-63.
- Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 2004;113:115-23.
- Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor- α and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res* 2001;2:269-72.
- Obin M, Shang F, Gong X, Handelman G, Blumberg J, Taylor A. Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *Faseb J* 1998;12:561-9.
- Adams V, Mangner N, Gasch A, Krohne C, Gielen S, Hirner S, et al. Induction of MuRF1 is essential for TNF- α -induced loss of muscle function in mice. *J Mol Biol* 2008;384:48-59.
- Hasselgren PO, Fischer JE. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg* 2001;233:9-17.
- Jagoe RT, Goldberg AL. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4:183-90.
- Huang J, Forsberg NE. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:12100-5.

35. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J* 2004;18:39-51.
36. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb J* 2005;19:362-70.
37. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004;119:285-98.
38. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* 2000;289:2363-6.
39. Allen DL, Cleary AS, Speaker KJ, Lindsay SF, Reed JM, Madden MC. Expression of components of the myostatin signaling pathway in fasting mouse skeletal muscle and adipose. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S33.
40. Powers SK, Kavazis AN, DeRuisseau KC. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R337-44.
41. Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkowitz C, England BK, Ding X et al. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest* 1996;98:1703-8.
42. May RC, Kelly RA, Mitch WE. Mechanisms for defects in muscle protein metabolism in rats with chronic uremia. Influence of metabolic acidosis. *J Clin Invest* 1987;79:1099-103.
43. Sostaric S, Pearce A, Gatt B, McKenna MJ, Stathis C, Goodman C. Effects of mild electro-stimulation treatment on healthy humans following exercise induced muscle damage. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S76.
44. Kerksick C, Robertts M, Dalbo V, Willoughby D. Changes in skeletal muscle proteolytic gene expression after prophylactic supplementation of EGCG and NAC and eccentric damage. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S109.
45. Moore NA, Devaney JM, Hoffman E, Zambraski E, Gordish H, Clarkson PM. Association of Akt2 genotypes and exercise muscle damage. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5):S32.
46. Marcinek DJ, Smith SR, Remmen HV. Increased mitochondrial content in response to mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of Cu, Zn superoxide dismutase knockout mice. *Faseb J* 2008;22:958.5.