

# Disminución de la expresión de la bomba de calcio sarcoplásmica (SERCA2) en el músculo esquelético de pacientes con EPOC y bajo peso corporal

Montse Morlà<sup>a</sup>, Amanda Iglesias<sup>a</sup>, Jaume Sauleda<sup>b</sup>, Borja Cosío<sup>b</sup>, Àlvar Agustí<sup>a,b</sup> y Xavier Busquets<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS). Palma de Mallorca. Balears. España.

<sup>b</sup>Servei de Pneumologia. Hospital Universitari Son Dureta. Palma de Mallorca. Balears. España.

<sup>c</sup>Departament de Biologia. Universitat Illes Balears (UIB). Palma de Mallorca. Balears. España.

**OBJETIVO:** Determinar las concentraciones y el estado de nitrosinación de SERCA2 (adenosintrifosfatasa de calcio del retículo sarcoplásmico) en biopsias del cuádriceps femoral de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e índice de masa corporal (IMC) normal o bajo.

**PACIENTES Y MÉTODOS:** Los pacientes se distribuyeron en 2 grupos (n = 7) según su IMC fuera normal (> 21 kg/m<sup>2</sup>) o bajo (< 21 kg/m<sup>2</sup>). En ambos grupos se realizó una espirometría forzada, se determinó la concentración de gases en sangre y se efectuaron biopsias percutáneas de aguja de la porción lateral del cuádriceps femoral. En estas biopsias se determinó la concentración de SERCA2 mediante inmunotransferencia y se evaluó si se encontraba nitrosinada mediante inmunoprecipitación de SERCA2 con un anticuerpo antinitrotirosina y posterior determinación de la concentración de SERCA2 nitrosinada mediante inmunotransferencia.

**RESULTADOS:** La expresión de SERCA2 era significativamente inferior en los pacientes con IMC bajo (4,2 ± 0,5 frente a 8,1 ± 1,2 IOD; p < 0,05). En estos pacientes, además, SERCA2 se encontraba nitrosinada. Por último, se observó una relación negativa y significativa entre los valores de SERCA2 y las concentraciones de la óxido nítrico sintetasa inducible (tomadas de un trabajo anterior realizado con las mismas biopsias) en pacientes con EPOC y bajo peso corporal (r = -0,89; p = 0,007), relación que no existía en pacientes con EPOC e IMC normal (r = 0,35; p = 0,43).

**CONCLUSIONES:** SERCA2 se encuentra disminuida y nitrosinada en el músculo esquelético de los pacientes con EPOC y bajo peso corporal, comparados con aquéllos con peso normal. Esta observación señala una nueva alteración celular en el músculo esquelético de los pacientes con EPOC y bajo peso muscular.

**Palabras clave:** *Cachexia. Bronquitis crónica. Enfisema. Tabaco.*

Estudio financiado en parte por ABEMAR, FIS (PI 020978), Red Respira (RTIC C03/11) y SEPAR.

Correspondencia: Dr. X. Busquets.

Unidad de Investigación. Hospital Universitario Son Dureta (Edificio D, primera planta).

Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca. Balears. España.  
 Correo electrónico: busquets@hsd.es

Recibido: 7-10-2005; aceptado para su publicación: 20-3-2006.

Reduced Expression of the Sarcoplasmic Calcium Pump SERCA2 in Skeletal Muscle From Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Low Body Weight

**OBJECTIVE:** To compare the concentrations and extent of nitration of sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> adenosine triphosphatase 2 (SERCA2) in biopsies of the quadriceps femoris from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) who have normal or low body mass index (BMI).

**PATIENTS AND METHODS:** The patients were divided into 2 groups (n=7, each group), one containing individuals with normal BMI (>21 kg/m<sup>2</sup>) and the other with low BMI (<21 kg/m<sup>2</sup>). Forced spirometry and blood gas analysis were performed in both groups and percutaneous needle biopsies of the lateral portion of the quadriceps femoris muscle were performed. Western blots were used to assess the concentration of SERCA2 in the biopsy material. To determine whether or not the protein was tyrosine-nitrated, immunoprecipitation of SERCA2 was performed with an antinitrotyrosine antibody followed by Western blotting to determine the concentration of the tyrosine-nitrated protein.

**RESULTS:** Expression of SERCA2 was significantly lower in patients with low BMI (4.2 [0.5] vs 8.1 [1.2] integrated optical density units, P<.05). SERCA2 was also tyrosine-nitrated in the patients with low BMI. Finally, a significant negative correlation was observed between the concentration of SERCA2 and that of inducible nitric oxide synthase (determined in a previous study using the same biopsy material) in patients with COPD and low BMI (r=-0.89, P=.007), while such a correlation was not observed in patients with COPD and normal BMI (r=0.35, P=.43).

**CONCLUSIONS:** In patients with COPD, SERCA2 concentration is reduced and the protein is tyrosine-nitrated in skeletal muscle from patients with low BMI compared to those with normal BMI. These results indicate the presence of a previously unrecognized cellular alteration in skeletal muscle from patients with COPD and low muscle weight.

**Key words:** *Cachexia. Chronic bronchitis. Emphysema. Smoking.*

## Introducción

La disfunción del músculo esquelético (DME) es frecuente en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en particular aquéllos con bajo peso corporal<sup>1</sup>. Este hecho es clínicamente relevante, ya que limita su capacidad de ejercicio y empeora tanto el pronóstico como la calidad de vida<sup>1-3</sup>. Los mecanismos celulares que subyacen en el desarrollo de la DME en la EPOC son poco conocidos<sup>4,5</sup>. Para poder desarrollar nuevos tratamientos dirigidos a paliar la DME en pacientes con EPOC es esencial mejorar este conocimiento.

El ciclo de contracción/relajación del músculo esquelético está regulado por la concentración citoplásmica de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La familia de proteínas denominada adenosintrifosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SERCA) constituye un elemento regulador clave de la concentración citoplásmica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Al secuestrar  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior del retículo sarcoplásmico, SERCA induce y mantiene la relajación muscular<sup>6,7</sup>. Hay al menos 3 genes que codifican esta familia de proteínas: a) *SERCA1*, que se expresa en fibras esqueléticas de contracción rápida; b) 2 variantes de ARN mensajero que se expresan en fibras de contracción lenta, en el músculo cardíaco o en la musculatura lisa (*SERCA2a*), y también en una variedad de tejidos no musculares (*SERCA2b*), y finalmente c) *SERCA3*, que también se expresa en una gran variedad de tejidos<sup>7</sup>.

No se ha investigado el papel potencial de las alteraciones en la expresión y/o función de SERCA en el músculo esquelético de los pacientes con EPOC. En el presente estudio se ha determinado la expresión de SERCA2 mediante inmunotransferencia (*Western blot*) en 2 grupos de pacientes con EPOC (con peso normal y con peso bajo). Las biopsias obtenidas de estos pacientes se habían utilizado en un trabajo anterior donde se determinó la concentración de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)<sup>8</sup>. Precisamente en este contexto se ha investigado la posibilidad de que SERCA2 esté nitrosinada en el músculo esquelético de estos pacientes. Ello se fundamenta en que nuestro grupo<sup>8</sup> y otros autores<sup>9</sup> han demostrado la presencia de estrés nitrosativo en el músculo esquelético de pacientes con EPOC y bajo peso corporal, y en que tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo alteran la actividad de SERCA<sup>10-13</sup>.

## Pacientes y métodos

### Pacientes

El diagnóstico de EPOC se realizó de acuerdo con los criterios establecidos internacionalmente por la European Respiratory Society y la American Thoracic Society (ERS/ATS)<sup>14</sup>. Los pacientes pertenecían a nuestra consulta externa y presentaban obstrucción al flujo aéreo intensa o muy intensa según la clasificación ERS/ATS<sup>14</sup>. Todos ellos tenían hábitos sedentarios. Se les estudió en situación clínica estable, que se definió por la ausencia de un cambio de tratamiento y/o exacerbación durante los 3 meses previos al estudio. Todos ellos recibieron tratamiento broncodilatador, combinado con esteroides inhalados en 9 casos. Ninguno recibió esteroides orales. Para evitar factores de confusión sobre el músculo, sólo se estudió a varones y se excluyó a los pacientes que presentaban otras enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades

de neuromusculares, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, hepatopatía, diabetes mellitus y alcoholismo. Los pacientes se distribuyeron en 2 grupos según su índice de masa corporal (IMC) fuera mayor o menor<sup>15</sup> de 21 kg/m<sup>2</sup>. Todos firmaron un consentimiento informado y la comisión de ética del hospital aprobó el estudio.

### Función pulmonar

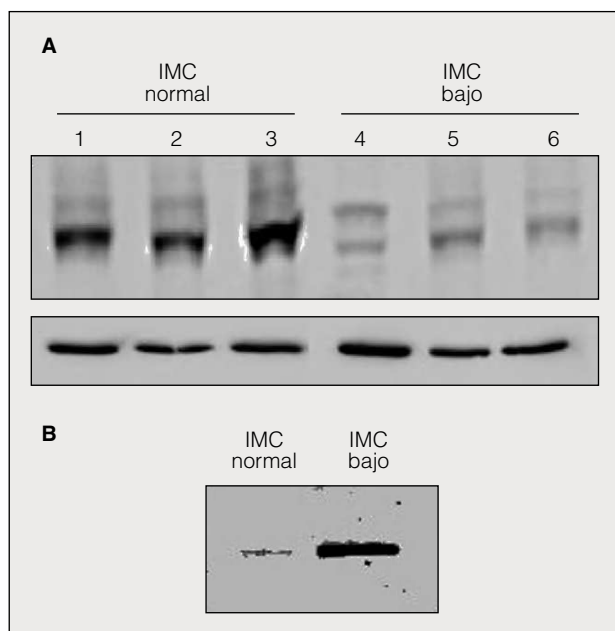
La espirometría forzada (GS, Warren E. Collins, Braintree, MA, EE.UU.) se midió en todos los participantes del estudio de acuerdo con las recomendaciones internacionales<sup>16</sup>; los valores de referencia fueron los de la población mediterránea<sup>17</sup>. Las presiones arteriales de gases en sangre (IL BG3, Izasa, Barcelona, España) se determinaron en sangre arterial.

### Biopsias musculares

Las biopsias percutáneas de aguja se obtuvieron de la porción lateral del cuádriceps femoral bajo anestesia local, tal como se ha descrito previamente<sup>18</sup>. Las biopsias musculares se congelaron inmediatamente y se guardaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Las biopsias obtenidas de estos pacientes se habían utilizado en un trabajo anterior donde se determinó la concentración de la iNOS<sup>8</sup>.

### Inmunodetección de SERCA2 y $\alpha$ -tubulina

Las técnicas de inmunotransferencia (*Western blot*) se llevaron a cabo, tal como se ha descrito con anterioridad, en nuestro laboratorio<sup>8,15</sup>. Brevemente, las muestras musculares congeladas (5-10 mg) se homogeneizaron (1:10 w/v) en un tampón con 10 mM de Tris y pH de 7,5 frío, que contenía un 1% de SDS y una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las muestras se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4  $^{\circ}\text{C}$ . Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante resultante con un volumen igual de tampón de carga (125 mM de Tris, pH de 6,8, un 4% de SDS, un 20% de glicerol, un 10% de 2-mercaptoetanol y un 0,005% de azul de bromofenol). La mezcla se hirvió durante 4 min y se guardó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para análisis posteriores. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford<sup>19</sup>. Entre 20 y 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión resultante se cargaron en un gel al 10% de poliacrilamida y se procedió a su electroforesis (SDS-PAGE). Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Western blot*) y se incubaron en PBS que contenía un 4% de leche en polvo desnatada (solución bloqueante) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4  $^{\circ}\text{C}$  en solución bloqueante que contenía el anticuerpo primario y, después de su lavado con PBS, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios. Se usaron los siguientes anticuerpos: anti-SERCA2 a una dilución de 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, EE.UU.) y anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EE.UU.) a una dilución de 1:2000. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron un anticuerpo antiinmunoglobulina G de conejo ligado a peroxidasa de rábano para SERCA2 y un anticuerpo antiinmunoglobulina G de ratón ligado a peroxidasa de rábano para la  $\alpha$ -tubulina (Amersham International, Buckinghamshire, Reino Unido). La inmunoreactividad se detectó mediante un sistema quimioluminiscente de detección de *Western blot* (Pierce, Rockford, Illinois, EE.UU.). Para ello, se agregaron 2 ml del reactivo de detección (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce) a la membrana de nitrocelulosa y se dejó actuar durante 30 s. Seguidamente las bandas resultantes se detectaron mediante el sistema de detección de quimioluminiscencia GeneGenius (Syngene, Cambridge, Reino



**Fig. 1. Panel A:** inmunotransferencia representativa de SERCA2 en el cuádriceps femoral de 3 pacientes con EPOC e índice de masa corporal (IMC) normal (carriles 1-3) y 3 pacientes con EPOC e IMC bajo (carriles 4-6). **Panel B:** inmunotransferencia de SERCA2 una vez inmunoprecipitada a partir de extractos de cuádriceps femoral obtenidos de pacientes con IMC bajo (n = 7) o normal (n = 7).

Unido). La intensidad de las bandas se determinó por análisis densitométrico usando el programa GeneTools (Syngene). Los resultados se normalizaron siempre por el contenido de  $\alpha$ -tubulina.

#### Inmunoprecipitación de SERCA2 mediante anticuerpos antinitrotirosina

Los 2 conjuntos de sobrenadantes congelados obtenidos tal como se ha descrito (IMC menor o mayor de 21 kg/m<sup>2</sup>) se unificaron y se centrifugaron a 12.000 g durante 2 min a 4 °C. Se añadió a ambos sobrenadantes un anticuerpo monoclonal de ratón antinitrotirosina (HyCult Biotech, Uden, Países Bajos) a una dilución de 1:1000 y se incubó durante 2 h a 4 °C. Seguidamente, se añadieron 50  $\mu$ l de proteína-A-agarosa recombinante (Sigma) a la suspensión y se incubó durante 1 h a 4 °C. Las muestras se centrifugaron después durante 30 s a 12.000 g. Los sedimentos resultantes se lavaron 3 veces en 1 ml de TBS

**TABLA I**  
**Parámetros clínicos y funcionales de los pacientes incluidos en el estudio**

	IMC normal (n = 7)	IMC bajo (n = 7)
Edad (años)	61 $\pm$ 3	60 $\pm$ 3
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,5 $\pm$ 1	18,5 $\pm$ 1*
Hábito tabáquico (paquetes-año)	56 $\pm$ 8	47 $\pm$ 5
FEV <sub>1</sub> (% referencia)	39 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2*
FEV <sub>1</sub> /FVC (%)	44 $\pm$ 4	40 $\pm$ 3*
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	70 $\pm$ 3	69 $\pm$ 4
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	43 $\pm$ 3	41 $\pm$ 2

FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; IMC: índice de masa corporal; PaCO<sub>2</sub>: presión arterial de anhídrido carbónico; PaO<sub>2</sub>: presión arterial de oxígeno.  
\*p < 0,001

a 4 °C durante 20 min y se volvieron a suspender en 100  $\mu$ l. Esta suspensión se mezcló con el mismo volumen de tampón de carga (125 mM de Tris, pH de 6,8, un 4% de SDS, un 20% de glicerol, un 10% de 2-mercaptoetanol y un 0,005% de azul de bromofenol) y se hirvió durante 4 min. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford<sup>19</sup>. Se cargaron 50  $\mu$ l de la suspensión anterior en un gel del 10% de poliacrilamida y se procedió a su electroforesis (SDS-PAGE) procesándose y detectándose tal como se ha descrito anteriormente.

#### Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó el test de Mann-Whitney para establecer la significación estadística de las diferencias observadas entre los grupos estudiados. Las correlaciones entre las variables de interés se exploraron mediante el test de correlación de Spearman. Se consideró significativo un valor de p < 0,05.

#### Resultados

En la tabla I se recogen las características clínicas y funcionales de los pacientes estudiados. La edad fue similar en ambos grupos. El hábito tabáquico no fue diferente entre los pacientes con IMC bajo o normal. Ambos grupos mostraron obstrucción grave de las vías aéreas (particularmente los pacientes con IMC bajo) e hipoxemia arterial moderada sin hipercapnia.

En la figura 1 (panel A) se muestra un experimento de inmunotransferencia representativo de la expresión de SERCA2 en biopsias del cuádriceps femoral de 3 pacientes con EPOC e IMC normal (carriles 1-3) y 3 pacientes con EPOC e IMC bajo (carriles 4-6). Se observa que la expresión de SERCA2 está claramente reducida en estos últimos. En promedio, los valores de SERCA2 (normalizados por el contenido de  $\alpha$ -tubulina) eran significativamente inferiores en los pacientes con IMC bajo (4,2  $\pm$  0,5 frente a 8,1  $\pm$  1,2 IOD [densidad óptica integrada]; p < 0,05).

Los experimentos de inmunoprecipitación de los sobrenadantes de cuádriceps femoral con anticuerpo antinitrotirosina seguidos de detección de SERCA2 mediante inmunotransferencia demostraron que SERCA2 estaba nitrosinada en los pacientes con EPOC e IMC bajo, comparados con los que presentaban un IMC normal (fig. 1, panel B).

En un trabajo anterior habíamos demostrado la sobreexpresión de la iNOS en el cuádriceps femoral de pacientes con EPOC y bajo peso corporal<sup>8</sup>. En la figura 2 se observa la existencia de una relación negativa y significativa entre los valores de SERCA2 y las concentraciones de iNOS en pacientes con EPOC y bajo peso corporal (r = -0,89; p = 0,007), relación que no existe en pacientes con EPOC e IMC normal (r = 0,35; p = 0,43).

#### Discusión

SERCA2 es una proteína clave en la regulación de la concentración citosólica del Ca<sup>2+</sup> y, por tanto, de la función muscular<sup>6,7</sup>. La pérdida de la expresión de SERCA2 se ha descrito previamente en otras situaciones clínicas también caracterizadas por DME, como necrosis<sup>20</sup>, insu-

ficiencia cardíaca<sup>21</sup> y denervación muscular<sup>22</sup>. Sin embargo, hasta la fecha no se habían descrito alteraciones en la expresión de SERCA2 en la EPOC. En consonancia con estas observaciones previas, nuestros resultados muestran que la expresión de SERCA2 está disminuida en los pacientes con EPOC y bajo peso corporal (fig. 1, panel A).

Varios mecanismos celulares pueden explicar la pérdida de la expresión de SERCA2 en el músculo esquelético de pacientes con EPOC y bajo peso corporal. Por una parte, podría deberse a un aumento de la tasa de proteólisis y degradación. En apoyo de esta hipótesis, nuestros resultados muestran que SERCA2 está nitrosinada en los pacientes con IMC bajo (fig. 1, panel B), un cambio estructural que facilita su degradación a través de la vía de la ubiquitina-proteasoma<sup>10-13</sup>. En relación con lo anterior, nuestro grupo<sup>8</sup> y otros<sup>9</sup> han demostrado previamente la presencia de estrés nitrosativo y sobreexpresión de la iNOS en el cuádriceps femoral de pacientes con EPOC y bajo peso corporal. En la figura 2 se observa la existencia de una correlación negativa y significativa entre las concentraciones de SERCA2 y las de iNOS en los pacientes con EPOC y bajo peso corporal ( $r = -0,89$ ;  $p = 0,007$ ), relación que no se aprecia en los pacientes con EPOC e IMC normal ( $r = 0,35$ ;  $p = 0,43$ ). Este análisis comparativo ha podido realizarse porque las muestras utilizadas en este estudio son las mismas que empleó nuestro grupo para estudiar la expresión de la iNOS<sup>8</sup> en el músculo esquelético de pacientes con EPOC. Estas observaciones son indicativas de una relación causal entre la inducción de iNOS y la pérdida de SERCA2 por nitrosinación y degradación en el músculo esquelético de los pacientes con EPOC y bajo peso corporal.

En nuestro estudio no podemos excluir que procesos de remodelación de fibras musculares, como disminución del diámetro, contribuyan a explicar la disminución de SERCA2. En este contexto hay que señalar que precisamente en vastus lateralis de pacientes con EPOC y pérdida de masa muscular se ha documentado una atrofia específica en las fibras de contracción rápida IIA/IIX y IIX<sup>23</sup>. Dado que SERCA2 se expresa en fibras de contracción lenta<sup>7</sup>, no parece que la disminución de su concentración sea debida a este proceso atrofico de las fibras musculares. Ello apunta a que la disminución de SERCA2 está relacionada con su nitrosinación y activación de procesos proteolíticos. En futuros estudios intentaremos determinar la presencia de ubiquitinización en SERCA2 nitrosinada y la activación del proteasoma.

Estudios realizados en humanos han dado como resultado la ausencia de modulación de la expresión de SERCA2 en el músculo esquelético tras ejercicio continuado<sup>24</sup>. Por lo anterior, y por la naturaleza sedentaria de los pacientes con EPOC, es razonable considerar que la actividad física no desempeña un papel importante en la disminución de SERCA2 en nuestro estudio. Independientemente de la causa o causas por las que la concentración de SERCA2 es baja en pacientes con EPOC y bajo peso corporal, esta baja concentración de SERCA2 podría contribuir a la patogenia de la DME de estos pacientes a través de varias vías. Estudios in vitro

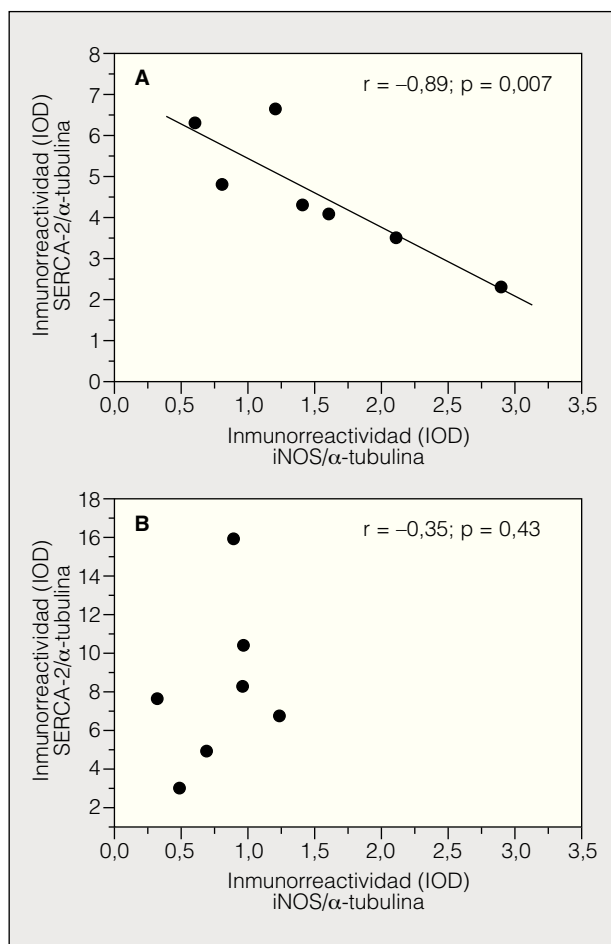


Fig. 2. Relación entre las concentraciones de SERCA2 y la expresión de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) en el músculo esquelético de pacientes con EPOC e índice de masa corporal bajo (panel A) y normal (panel B). IOD: densidad óptica integrada.

han demostrado que la nitrotirosinación de SERCA origina su inactivación<sup>12</sup>. Por tanto, es probable que en pacientes con EPOC que pierden peso la SERCA2 no sólo esté disminuida (fig. 1, panel A), sino que también esté inactivada por nitrotirosinación (fig. 1, panel B). En un contexto especulativo, ambas anomalías pueden alterar la homeostasis del calcio iónico y contribuir hipotéticamente a la DME al menos de 2 maneras diferentes: pueden alterar de forma negativa los ciclos de contracción y relajación del músculo<sup>6,7</sup>, y por otra parte, el exceso de  $Ca^{2+}$  puede fijar calcineurina<sup>25</sup> y alterar la expresión de varios factores de transcripción dependientes de calcio, MEF2 (*Drosophila melanogaster MAD5 domain transcription factor 2*) y MyoD (*Drosophila melanogaster myogenic-determination protein*)<sup>26,27</sup>, que son claves para el mantenimiento y la regeneración del músculo esquelético.

En resumen, estos resultados muestran por primera vez que los pacientes con EPOC y bajo peso corporal presentan menor expresión de SERCA2 en el músculo esquelético, que ésta se encuentra nitrosinada y que existe una correlación negativa entre las concentra-



nes de SERCA2 y las de iNOS en pacientes con IMC bajo. El papel que pueden desempeñar estas alteraciones celulares en la pérdida de masa muscular y/o en la DME de estos pacientes deberá evaluarse en futuros estudios.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Thoracic Society and European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:S1-S40.
2. Landbo C, Prescott E, Lange P, Vestbo J, Almdal TP. Prognostic value of nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1856-61.
3. Schols AM, Slangen J, Volovics L, Wouters EF. Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:1791-7.
4. Agustí AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003;21:347-60.
5. Debigare R, Cote CH, Maltais F. Peripheral muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. Clinical relevance and mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164:1712-7.
6. Kirtley ME, Sumbilla C, Inesi G. Mechanisms of calcium uptake and release by sarcoplasmic reticulum. En: Alan R, editor. *Intracellular calcium regulation.* New York: Wiley-Liss; 1999. p. 543-64.
7. Aubier M, Viïres N. Calcium ATPase and respiratory muscle function. *Eur Respir J.* 1998;11:758-66.
8. Agustí A, Morla M, Sauleda J, Saus C, Busquets X. NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight. *Thorax.* 2004;59:483-7.
9. Barreiro E, Gea J, Corominas JM, Hussain SN. Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29:771-8.
10. Astier C, Rock E, Lab C, Gueux E, Mazur A, Rayssiguier Y. Functional alterations in sarcoplasmic reticulum membranes of magnesium-deficient rat skeletal muscle as consequences of free radical-mediated process. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:667-74.
11. Castilho RF, Carvalho-Alves PC, Vercesi AE, Ferreira ST. Oxidative damage to sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump induced by Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ascorbate is not mediated by lipid peroxidation or thiol oxidation and leads to protein fragmentation. *Mol Cell Biochem.* 1996;159:105-14.
12. Grover AK, Kwan CY, Samson SE. Effects of peroxynitrite on sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump isoforms SERCA2b and SERCA3a. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285:C1537-C43.
13. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1995;92:778-84.
14. Celli BR, MacNee W, Agustí AG, Anzueto A, Berg B, Buist AS, et al. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* 2004;23:932-46.
15. Agustí AG, Sauleda J, Miralles C, Gómez C, Togores B, Sala E, et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:485-9.
16. American Thoracic Society Official Statement. Standardization of spirometry. 1994 Update. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;152:1107-36.
17. Roca J, Sanchis J, Agustí-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1986;22:217-24.
18. Dubowitz V, Brooke MH. The procedure of muscle biopsy. In: Dubowitz V, Brooke MH, editors. *Muscle biopsy: a modern approach.* London, Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1973. p. 5-19.
19. Bradford MA. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-52.
20. Zador E, Mendler L, Ver Heyen M, Dux L, Wuytack F. Changes in mRNA levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *Biochem J.* 1996;320:107-13.
21. Simonini A, Chang K, Yue P, Long CS, Massie BM. Expression of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase is reduced in rats with postinfarction heart failure. *Heart.* 1999;81:303-7.
22. Schulte L, Peters D, Taylor J, Navarro J, Kandarian S. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump expression in denervated skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1994;267:C617-C22.
23. Gosker HR, Engelen MP, Van Mameren H, Van Dijk PJ, Van der Vusse GJ, Wouters EF, et al. Muscle fiber type IIX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:113-9.
24. Green HJ, Ballantyne CS, Mac Dougall JD, Tarnopolsky MA, Schertzer JD. Adaptations in human muscle sarcoplasmic reticulum to prolonged submaximal training. *J Appl Physiol.* 2003;94:2034-42.
25. Friday BB, Mitchell PO, Kegley KM, Pavlath GK. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation.* 2003;71:217-27.
26. Liu Y, Shen T, Randall WR, Schneider MF. Signaling pathways in activity-dependent fiber type plasticity in adult skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2005;26:13-21.
27. Hawke TJ, Kanatous SB, Martin CM, Goetsch SC, Garry DJ. Rad is temporally regulated within myogenic progenitor cells during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C379-C87.