



ORIGINAL

Efecto del alprostadil en los cultivos de músculo esquelético isquémico. Estudio proteómico comparativo frente a músculo sano[☆]



M. Guerra Requena^{a,*}, C. Morata Barrado^a, J. Modrego Martín^b, P. Rodríguez Sierra^b, A. López Farré^b, J. Serrano Hernando^c y G. Moñux Ducajú^c

^a Servicio de Angiología, Cirugía Vascular y Endovascular, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, España

^b Unidad de Investigación Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España

^c Servicio de Angiología y Cirugía Vascular, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, España

Recibido el 2 de julio de 2013; aceptado el 23 de diciembre de 2013

Disponible en Internet el 11 de marzo de 2014

PALABRAS CLAVE

Proteómica;
Alprostadil;
Músculo esquelético

Resumen

Introducción: El alprostadil tiene efecto vasodilatador y antiagregante. Es bien conocido su efecto endotelial, pero se desconocen sus posibles efectos pleiotrópicos sobre el músculo esquelético y si estos difieren en el músculo isquémico.

Objetivo: Determinar el efecto del alprostadil sobre el metabolismo del músculo esquelético y valorar diferencias en su acción sobre el músculo isquémico frente al sano.

Material y métodos: Se obtuvieron muestras de tejido de 10 pacientes con isquemia irreversible intervenidos de amputación supracondílea, tanto de músculo isquémico (extensor corto de los dedos del pie, grupo I) como de músculo sano (músculo cuádriceps del borde de amputación, grupo S). Ambos grupos se cultivaron basalmente y con 5 ng de alprostadil. Se analizó la expresión proteómica de las siguientes enzimas: triosa-fosfato-isomerasa (TPI), malato deshidrogenasa (MDH), lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato carboxilasa (PC). Se determinaron también sus productos, lactato y piruvato.

Resultados: La MDH presentó una disminución en el grupo I en las muestras basales (2.196 ± 348 grupo S vs 644 ± 192 grupo I, $p < 0,05$). La PC estaba aumentada en el grupo I en ambos tipos de muestras (basal: $1,80 \pm 1,27$ vs $3,16 \pm 2,25$; alprostadil: $6,72 \pm 2,13$ vs $8,16 \pm 3,63$, grupo S vs grupo I, respectivamente, $p < 0,05$). No hubo diferencias significativas en la concentración de lactato ni en la de piruvato.

Conclusiones: La reducción de MDH en el músculo isquémico sugiere una reducción del ciclo de Krebs. El alprostadil estimula la expresión de PC, que induce la formación de oxalacetato; este se introduce en el ciclo de Krebs, permitiéndole funcionar parcialmente en el músculo isquémico y mejorando la obtención de energía.

© 2013 SEACV. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

[☆] Trabajo presentado como Comunicación Oral en el 59 Congreso Nacional de la SEACV, Girona, 30 de mayo a 1 de junio de 2013. Obtuvo el Premio Martorell de dicho Congreso.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: merguerra24@gmail.com (M. Guerra Requena).

KEYWORDS

Proteomics;
Alprostadil;
Skeletal muscle

The effect of alprostadil on ischemic skeletal muscle cultures. Comparative proteomic study with healthy muscle

Abstract

Introduction: Alprostadil has vasodilator properties and inhibits platelet aggregation. Its effects on endothelial wall have been widely studied, but there is no knowledge about possible skeletal muscle effects, and differences with ischemic muscle.

Objective: To determine the effects of alprostadil on skeletal muscle metabolism, and to investigate possible differences with ischemic muscle.

Methods: Samples were obtained in 10 patients with leg above-knee amputation due to severe irreversible ischemia, of ischemic muscle (extensor digitorum brevis, group I), and healthy muscle (quadriceps femoris, amputation edge, group S). Muscle segments were incubated with alprostadil 5 ng, or without it (baseline). Proteomic analysis of metabolic enzymes was performed: Triose-phosphate isomerase (TPI), malate dehydrogenase (MDH), lactate dehydrogenase (LDH) and pyruvate carboxylase (PC). Lactate and pyruvate was also determined.

Results: A decrease in malate dehydrogenase was observed in group I in the baseline samples (2196 ± 348 group S vs 644 ± 192 group I, $P < .05$). PC was increased in both samples in group I (baseline: 1.80 ± 1.27 vs 3.16 ± 2.25 ; alprostadil: 6.72 ± 2.13 vs 8.16 ± 3.63 , group S vs group I, respectively, $P < .05$). No changes were observed in pyruvate and lactate.

Discussion: Decreased MDH in ischemic muscle suggests a Krebs cycle reduction. Alprostadil stimulates the expression of PC, which leads to oxaloacetate production. This product is inserted in Krebs cycle, improving energy obtaining. In this manner, Krebs cycle can work partially in ischemic muscle.

© 2013 SEACV. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El alprostadil (prostaglandina E1) es una prostaglandina natural presente en las vesículas seminales y tejidos del cuerpo cavernoso de los varones y en la placenta y el *ductus arteriosus* del feto. Tiene un efecto reconocido como vasodilatador y antiagregante, por lo que es utilizado actualmente en el tratamiento de los pacientes con isquemia crítica (estadios III y IV de Fontaine) no revascularizable, y en los pacientes con isquemia crítica que son revascularizados como terapia adyuvante para mejorar la perfusión tisular periférica¹⁻⁴.

Se conoce bien el efecto que realiza este fármaco a nivel del endotelio, pero no se conoce con exactitud si produce algún efecto sobre el músculo esquelético, y si tiene diferentes acciones en el músculo esquelético isquémico frente al músculo esquelético sano.

Objetivo

Determinar el efecto del alprostadil sobre el proteoma (expresión proteica) del músculo esquelético isquémico a nivel de las enzimas metabólicas, comparando con la expresión proteica del músculo esquelético sano.

Material y método**Muestras**

Entre febrero y noviembre de 2011 se obtuvieron muestras de 10 pacientes sometidos a amputación supracondílea de extremidad inferior. Los criterios de inclusión fueron

isquemia crónica avanzada de la extremidad (estadios III y IV de la clasificación de Fontaine), no revascularizable, con oclusión femoropoplítea en la exploración física, y buenos registros de volumen del pulso (PVR) a nivel del muslo distal en el estudio hemodinámico. Se excluyeron los enfermos con infección activa severa en el pie o que hubieran recibido tratamiento anteriormente con alprostadil. En los casos en que el paciente estuviera tomando estatinas y antiagregantes previamente, se realizó un periodo de lavado de los mismos de al menos 10 días. La selección se realizó de forma consecutiva.

En todos los pacientes se obtuvo consentimiento informado para su participación y el estudio fue aprobado por el Comité Ético del centro donde se llevó a cabo la obtención y el procesamiento de muestras.

Se recogieron las siguientes características de los pacientes: edad; sexo; factores de riesgo cardiovascular: hipertensión arterial (presión arterial sistólica > 140 mmHg o con tratamiento antihipertensivo), diabetes mellitus (glucemia basal > 110 mg/dl o HbA1c $> 7\%$, o tratamiento con antidiabéticos orales o insulina), dislipidemia (cifras de colesterol total > 240 mg/dl, triglicéridos > 150 mg/dl o ratio HDL/LDL $< 0,3$, o con tratamiento hipolipemiante), fumador (habitual o exfumador de menos de un año); enfermedad coronaria (historia de angina de pecho, infarto agudo de miocardio o revascularización miocárdica quirúrgica o percutánea); insuficiencia renal (valores de creatinina $> 1,5$ mg/dl) y enfermedad cerebrovascular (antecedente de ictus, ataque isquémico transitorio o revascularización carotídea previa).

En cada paciente se obtuvieron especímenes de 2 localizaciones: muestras de músculo isquémico (extraído del músculo extensor corto de los dedos a nivel del pie) o

grupo I, y muestras de músculo sano del borde de amputación (músculo cuádriceps) o grupo S.

El material obtenido se conservó en medio estándar RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) blanco en condiciones estériles y se cultivó de forma inmediata.

Cultivo

Las piezas quirúrgicas se cortaron en piezas de 10 mm de diámetro y se cultivaron en placas de cultivo con medio SG-2 (Humedia-SG2, Kurabou Enterprises, Osaka, Japón) en una atmósfera de 95% O₂ 5% CO₂ a 37 °C durante 48 h y bajo condiciones estériles. De cada grupo de muestras (I y S) se realizaron 2 cultivos, uno basal, sin fármaco, y otro con alprostadil, a una concentración de 5 ng/ml. La concentración se basó en estudios similares realizados en células endoteliales^{4,5}. El medio se cambió cada 12 h. Por tanto, de cada paciente se obtuvieron 4 cultivos (grupo I basal, grupo I con alprostadil, grupo S basal, grupo S con alprostadil).

Las muestras de músculo fueron homogeneizadas con un Ultra-Turrax T8 IKA-Werke en un tampón conteniendo 8 mol/l de urea, CHAPS 2% p/v, 40 mmol/l de ditiotretitol, anfólito Bio-LyteTH 0,2% (Bio-Rad) y 0,01% p/v de azul bromofenol. Los tejidos homogeneizados fueron centrifugados a 10.000 g durante 10 min y el sobrenadante se conservó a -80 °C para su posterior análisis.

Análisis proteómico

El mapa de expresión proteica del músculo se realizó mediante una doble electroforesis, según la técnica descrita en publicaciones previas⁶, la primera en un gradiente de pH inmovilizado (IPG-strips, BioRad) y la segunda sobre geles de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) al 10%.

La cuantificación de proteína se realizó utilizando la reacción del ácido bicinónico (Pierce).

Para la primera dimensión de la doble electroforesis se cargaron muestras de 250 µg de proteína total en tiras de geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un pH de 3 a 10. El foco isoelectrico se realizó con el sistema *Protean IEF cell system* (Bio-Rad Labs) a 50 V durante 60 h seguido de rápidas subidas lineales de tensión y voltaje limitados por una corriente máxima de 50 µA por gel.

Tras la electroforesis por isoelectroenfoque se realizó la segunda dimensión con las proteínas de las tiras, que fueron disueltas en geles de electroforesis de SDS-PAGE al 10% mediante el sistema Protean II XL (Bio-Rad Labs).

A continuación, los geles fueron fijados y teñidos con plata con el kit Silver Stain Plus (Bio-Rad Labs), siguiendo las instrucciones del fabricante, y después escaneados (escáner UMAX POWERLOOK III), mediante el software Magic Scan V4.5. El análisis de imagen se llevó a cabo con el programa Quantity One 4.2.3 (Bio-Rad Labs).

Para la espectrometría de masas (EM), las manchas de interés (las proteínas a estudio) se recortaron de los geles teñidos con plata y fueron digeridas con tripsina modificada (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Las muestras se analizaron utilizando un Analizador Proteómico 4700 (Applied Biosystem), funcionando en modo reflector positivo. Los datos generados del espectro permitieron identificar las

Tabla 1 Características clínicas de los pacientes

Edad (años)	76 (63-84)
Sexo varón	8/10
Hipertensión arterial	7/10
Diabetes mellitus	7/10
Dislipidemia	5/10
Fumador	4/10
Enfermedad coronaria	5/10
Insuficiencia renal	3/10
Enfermedad cerebrovascular	3/10

proteínas mediante la huella peptídica, usando el programa MASCOT y comparando con la base de datos Mascot 1.9 (<http://www.matrixscience.com>). Las identificaciones obtenidas por la EM se aceptaron basándose en una evaluación triple que tiene en cuenta datos de peso molecular, anotación del espectro y migración esperada versus observada en los geles de doble electroforesis.

El análisis proteómico que realizamos se centró en las principales proteínas implicadas en las distintas vías metabólicas de la célula muscular: triosa-fosfato-isomerasa (TPI), malato deshidrogenasa (MDH), lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato carboxilasa (PC).

Determinación de lactato y piruvato

Para la determinación del piruvato y del lactato, productos de las vías metabólicas analizadas, se emplearon, respectivamente, los kits de ensayo K609-100 y K607-100 (BioVision Research Products, CA, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante.

Estadística

El análisis estadístico se realizó mediante tests no paramétricos (U de Mann-Whitney, Wilcoxon). Se exigió un valor de $p < 0,05$ para considerar diferencias estadísticamente significativas. El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el programa SPSS para Windows.

Resultados

En la [tabla 1](#) se resumen las características clínicas de los pacientes. Los resultados del análisis proteómico de las enzimas estudiadas y la determinación de lactato y piruvato se representan en la [tabla 2](#) y en las [figuras 1 y 2](#).

En cuanto a los cultivos basales, se observó una disminución significativa de la MDH en el músculo isquémico respecto al músculo sano. En los cultivos con alprostadil no se observaron diferencias en la MDH entre ambos grupos, pero sí el aumento de la PC en el músculo isquémico respecto al sano.

La TPI, una de las enzimas claves en la regulación de la vía glucolítica, no mostró diferencias en el músculo isquémico frente al sano en las muestras basales, ni tampoco al incubarlo con alprostadil. No se obtuvieron tampoco diferencias significativas en la LDH (glucólisis anaerobia) en las muestras basales entre ambos grupos, aumentando de forma

Tabla 2 Proteínas implicadas en las distintas rutas metabólicas y sus productos

	Grupo S		Grupo I	
	Basal	Alprostadil	Basal	Alprostadil
TPI (UAD)	73 ± 15	50 ± 17	100 ± 39	55 ± 34
MDH (UAD)	2.196 ± 348*	2.088 ± 177	644 ± 192*	761 ± 273
LDH (105 UAE/ml)	35,75 ± 9,51	63,25 ± 9,98	35,36 ± 12,15	53,15 ± 7,72
Lactato (μmol/l)	0,22 ± 0,044	0,24 ± 0,046	0,109 ± 0,01	0,113 ± 0,01
Piruvato (μmol/l)	1,46 ± 0,28	1,53 ± 0,28	1,24 ± 0,31	1,59 ± 0,26
PC (UAD)	1,80 ± 1,27**	6,72 ± 2,13**	3,16 ± 2,25**	8,16 ± 3,63**

LDH: lactato deshidrogenasa; MDH: malato deshidrogenasa; PC: piruvato carboxilasa; TPI: triosa-fosfato-isomerasa; UAD: unidades arbitrarias densitométricas; UAE: unidades de actividad enzimática

* p < 0,05 grupo S vs grupo I.

** p < 0,05 basal vs alprostadil.

no significativa al incubar con alprostadil tanto en el grupo I como en el S.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de lactato ni piruvato en las muestras basales ni en las incubadas con fármaco en ninguno de los 2 grupos.

Discusión

Las proteínas están implicadas en todas las funciones celulares, controlan cualquier mecanismo que ocurre en el interior celular y son modificadas en diferentes enfermedades. El proteoma de una célula es el conjunto de proteínas que se expresan en una célula. Por lo tanto, el proteoma dicta el fenotipo de la célula y su funcionalidad, así como la funcionalidad del tejido en el cual la célula está contenida. El

fenotipo puede variar en condiciones normales, únicamente por el estado de crecimiento de la célula o la edad, además de evidentemente variar por la intervención en respuesta a los estímulos que aparecen durante enfermedades crónicas o agudas. Las proteínas pueden experimentar modificaciones postraduccionales debido a situaciones patológicas o incluso a tratamientos farmacológicos. El proteoma, por lo tanto, es un elemento dinámico de la célula, a diferencia del genoma, que es un elemento estático. La proteómica es el estudio del proteoma, o lo que es lo mismo, de las proteínas de una célula que se expresan en un momento dado, pero no solo las que aparecen en la célula mediante la expresión de un gen, sino también todas las modificaciones proteicas debidas a transcritos alternativos o modificados en el proceso postranslacional, así como la combinación de estos dos.

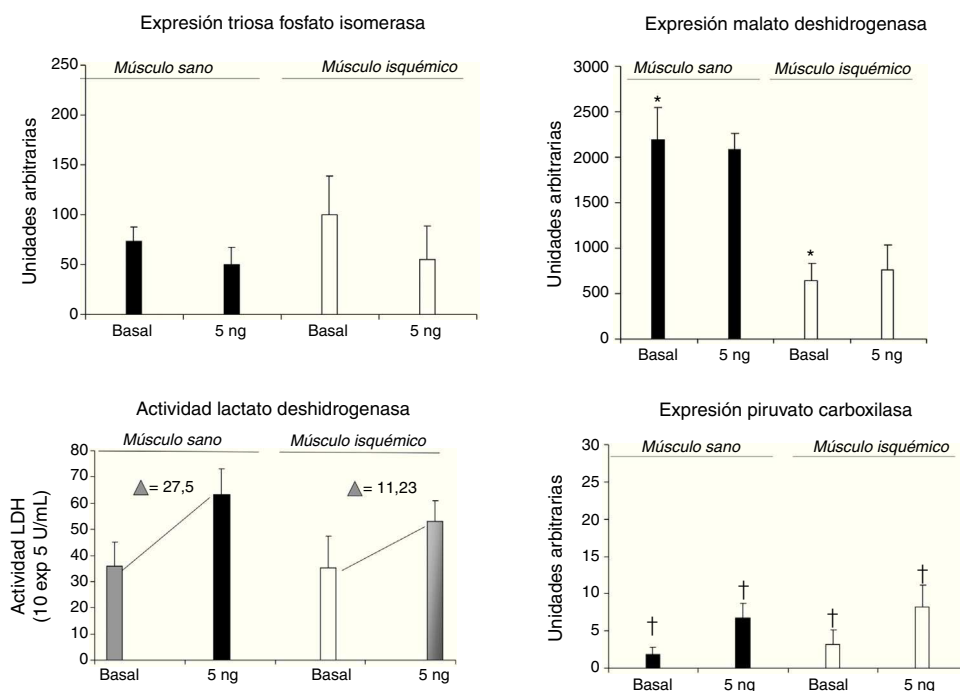


Figura 1 Expresión proteica de las enzimas analizadas. p < 0,05 grupo S vs grupo I.

† p < 0,05 basal vs alprostadil.

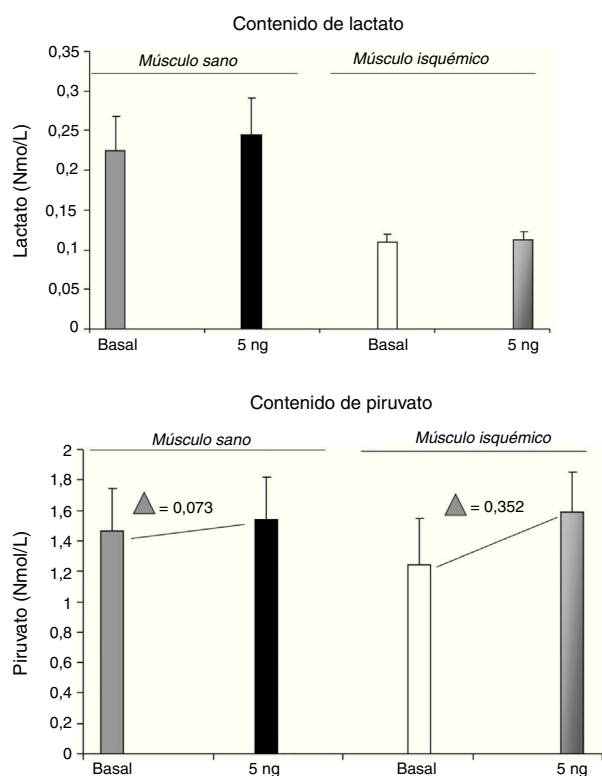


Figura 2 Valores de los productos metabólicos analizados.

En resumen, y en términos sencillos, la proteómica nos va a permitir comparar la expresión proteica general de las células, sometidas a diferentes maniobras experimentales. Hasta el momento actual la proteómica en investigación cardiovascular se ha realizado mayoritariamente en miocardiopatías^{7,8}.

La glucólisis es una de las vías metabólicas principales de obtención de la energía. Los 10 pasos enzimáticos de conversión de la glucosa en piruvato se continúan en condiciones aeróbicas con la reacción del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa.

Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas el piruvato es convertido en lactato en los tejidos musculares (fig. 3).

En los últimos años se han realizado múltiples estudios de proteómica en el músculo esquelético⁹. Los niveles de expresión y las modificaciones postraduccionales de las enzimas glucolíticas están claramente alterados durante el desarrollo, o distintos procesos adaptativos fisiológicos como la actividad neuromuscular aumentada o la atrofia por desuso. La vía glucolítica también se modifica en muchas enfermedades neuromusculares, incluyendo la debilidad en la contracción muscular relacionada con la diabetes, la distrofia muscular o la sarcopenia de la vejez.

La isquemia crónica de miembros inferiores supone una situación patológica a nivel del músculo, con una disminución del aporte sanguíneo, y con ello de oxígeno y otras sustancias, ante el que se establecen respuestas a nivel molecular. En este estudio hemos analizado la proteómica de las células musculares en pacientes con isquemia de la extremidad, a nivel de las principales enzimas metabólicas y sus productos, y su relación con el músculo sano. Asimismo,

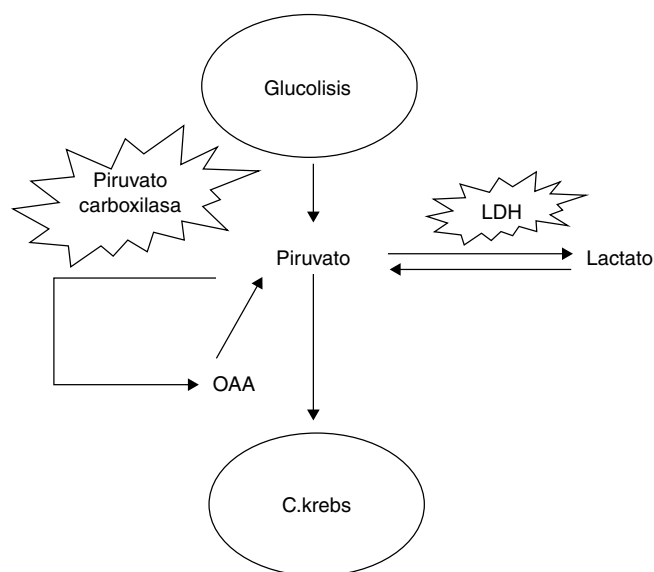


Figura 3 Esquema de las vías metabólicas. LDH: lactato deshidrogenasa. OAA: oxalacetato.

se estudia por primera vez el efecto del alprostadiol sobre ambos.

Hemos encontrado en el músculo isquémico una disminución de la malato deshidrogenasa, no encontrándose diferencias en la glucólisis (TPI) ni en la vía anaeróbica (LDH, lactato). El alprostadiol produjo un aumento de la piruvato carboxilasa (ciclo de Krebs) tanto en el músculo sano como en el isquémico.

La reducción de malato deshidrogenasa en el músculo isquémico sugiere una reducción del ciclo de Krebs, en relación con un menor aporte de oxígeno en el músculo isquémico. En estudios de realizados en músculo esquelético de pacientes ancianos se ha observado una disminución de la extracción de oxígeno y, mediante proteómica, una disminución de las enzimas mitocondriales o enzimas del ciclo de Krebs¹⁰⁻¹³.

Según los resultados obtenidos, el alprostadiol no modifica esta vía directamente pero estimula la expresión de piruvato carboxilasa, induciendo así la formación de oxalacetato, que se introduce en el ciclo de Krebs. Esto permite funcionar parcialmente el ciclo de Krebs en el músculo isquémico (fig. 3), mejorando así la obtención de energía.

Una de las limitaciones del estudio es que se ha realizado con cultivos de tejidos. Hay que contar con la limitación intrínseca que supone un estudio in vitro, que no refleja las distintas interacciones que tendrán lugar en el conjunto del organismo. Asimismo, la identificación de las proteínas mediante la doble electroforesis no es exacta, y puede subestimar la presencia de elementos poco abundantes, las proteínas integradas en la membrana o componentes con peso molecular muy elevado¹⁴⁻¹⁷. Además, las proteínas con valores de punto isoeléctrico (pI) extremos no suelen ser bien detectadas en sistemas con un amplio rango de pI. Otra cuestión importante es la distorsión de los puntos de proteínas debido a la presencia de distintas especies o isoformas con extensas modificaciones postraduccionales. El análisis mediante EM en ese sentido resuelve la mayoría de estos problemas.

Se ha considerado en este estudio como sano el músculo cuádriceps del borde de amputación, en pacientes que presentaban pulso femoral y buenos PVR en muslo, aunque en sentido estricto los pacientes con isquemia irreversible de la extremidad que precisan una amputación mayor no son pacientes «sanos». No se han usado en este caso muestras control, como por ejemplo de pacientes amputados por causa traumática, en los que no existieran antecedentes de enfermedad cardiovascular conocida. Asimismo hay que tener en cuenta que eran pacientes de edad avanzada, en los que de por sí, como ya se ha comentado, se han observado cambios en las enzimas mitocondriales asociados a la vejez. Otras características de los pacientes que podrían haber influido en los resultados son la presencia de diabetes mellitus o el uso de fármacos perioperatorios que pudieran haber modificado el metabolismo del músculo, aunque, como ya se ha comentado, se realizó un periodo de lavado de al menos 10 días en pacientes que previamente estuvieran tomando estatinas y antiagregantes.

En conclusión, es la primera vez que se estudia el efecto del alprostadil sobre músculo sano e isquémico en humanos. La reducción de malato deshidrogenasa en el músculo isquémico sugiere una reducción del ciclo de Krebs. El alprostadil no modifica esta vía pero estimula la expresión de piruvato carboxilasa, induciendo la formación de oxalacetato, que se introduce en el ciclo de Krebs. De este modo, el alprostadil permite funcionar parcialmente el ciclo de Krebs del músculo isquémico, mejorando la obtención de energía.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

Este proyecto recibió una Beca de Investigación de la Fundación SEACV, así como una Beca de Laboratorios Esteve.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*. 2007;45 Suppl:S5-67.
2. Marchesi S, Pasqualini L, Lombardini R, Vaudo G, Lupatelli G, Pirro M, et al. Prostaglandin E1 improves endothelial function in critical limb ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;41:249-53.
3. Schror K, Hohlfield T. Mechanisms of anti-ischemic action of prostaglandin E1 in peripheral arterial occlusive disease. *Vasa*. 2004;33:119-24.
4. Haider DG, Bucek RA, Giurgea AG, Maurer G, Glogar H, Minar E, et al. PGE1 analog alprostadil induces VEGF and eNOS expression in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:2066-72.
5. Fang WT, Li HJ, Zhou LS. Protective effects of prostaglandin E1 on human umbilical vein endothelial cell injury induced by hydrogen peroxide. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31:485-92.
6. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López-Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, et al. Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:1578-83.
7. Macri J, Rapundalo T. Application of proteomics to the study of cardiovascular biology. *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:66-75.
8. Arrell DK, Neverova I, van Eryk JE. Cardiovascular proteomics: Evolution and potential. *Circ Res*. 2001;88:763-73.
9. Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle glycolysis. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804:2089-101.
10. Johnson ML, Robinson MM, Nair KS. Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24:247-56.
11. Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, et al. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:5618-23.
12. Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:15364-9.
13. Lanza IR, Short DK, Short KR, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner MJ, et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes*. 2008;57:2933-42.
14. Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J Proteomics*. 2010;73:2064-77.
15. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4:3665-85.
16. Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*. 2006;6:4688-703.
17. Weiss W, Gorg A. High-resolution two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol*. 2009;564:13-32.