

Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas

Daniele Mendes Guizoni

Botucatu - São Paulo
- 2009 -

Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aluna: Daniele Mendes Guizoni
Orientadora: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi
Co-orientador: Ms. Paula Felipe Martinez

Botucatu - São Paulo
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Guizoni, Daniele Mendes.

Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas / Daniele Mendes Guizoni – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Marina Politi Okoshi

Co-orientador: Paula Felipe Martinez

1.Fibras 2. Massa muscular 3. Músculos - Desenvolvimento

Palavras-chave: Doenças crônicas; Miostatina; Músculo esquelético; Trofismo muscular

Dedicatória

Dedico aos meus pais, *Anderson* e *Mirian*, aos meus irmãos, *Júnior* e *Rodrigo*, e a toda minha família, por sempre me apoiarem em todas as conquistas da minha vida.

Agradecimientos

Primeiramente a *Deus*, por todas as oportunidades e conquistas alcançadas.

Aos meus pais, *Anderson* e *Mirian*, pela educação, carinho, paciência, amor, ensinamentos e dedicação em todo meu caminho.

Aos meus irmãos, *Junior* e *Rodrigo*, por serem exemplos na minha vida.

A todos os meus familiares, em especial meus avós, *Ângela* e *José*, *Paulina* e *Antônio*, por todo o carinho, afeto e cuidados.

Ao meu namorado *Guilherme*, por todo amor, carinho e conselhos, e por sempre me apoiar em todos os momentos.

Aos *grandes amigos de Botucatu*, por compartilharmos nossas dificuldades, alegrias e tristezas, e por todos os momentos felizes que me propiciaram nesta cidade.

A *XLII Turma do curso de Ciências Biológicas*, por ser fundamental em mais uma conquista da minha vida.

A todos os *professores e funcionários da Unesp de Botucatu*, por serem essenciais na minha formação como bióloga.

A *Profa. Dra. Maeli Dal Pai-Silva*, pela supervisão deste trabalho e pela participação na minha formação.

A *Paula Martinez*, pela co-orientação neste trabalho, por todo ensinamento, paciência, dedicação e carinho que sempre teve por mim.

Ao *Prof. Leonardo Zornoff*, pela leitura e correção deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Clínica Médica, em especial *Camila Bonomo*, *Díyon Campos*, *Marcelo Cezar*, *Ricardo Damatto* e *Sílvio Oliveira Jr*, pelos ensinamentos, pela paciência e por todos os bons momentos.

À grande amiga *Alíne Lima*, por ser essencial na elaboração deste trabalho, por toda a dedicação e ensinamentos.

A todos que fizeram e fazem parte da minha vida, **muito obrigada!**

*Agradecimento
especial*

Agradeço à *Profa. Dra. Marina Políti Okoshí*, pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos, paciência e dedicação como orientadora. Obrigada por participar da minha formação como bióloga e por ter sido fundamental na realização desta monografia.

Epígrafe

“Viver é desenhar sem borracha.”
Millôr Fernandes

MIOSTATINA E REDUÇÃO DA MASSA MUSCULAR EM DOENÇAS CRÔNICAS

MYOSTATIN AND MUSCLE MASS IN CHRONIC DISEASES

Título Resumido: Miostatina e Massa Muscular

¹Aluna: Daniele Mendes Guizoni

²Orientadora: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi

³Co-orientadora: Ms. Paula Felipe Martinez

¹ Graduanda de Ciências Biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP

² Profa. Dra. do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

³ Pós-Graduanda do Programa “Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Categoria da Seção na qual o Manuscrito será incluído: Artigo de Revisão

Endereço para Correspondência:

Profa. Dra. Marina Politi Okoshi
Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Rubivo Júnior, S/N

CEP 18.603-970

Fone: 14 3882 2969

Fax: 14 3882 2238

Cel: 14 9792 8023

Email: mpoliti@fmb.unesp.br

Este trabalho seguiu as normas para publicação da **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica.**

MIOSTATINA E REDUÇÃO DA MASSA MUSCULAR EM DOENÇAS CRÔNICAS

Descritores: Miostatina, Doenças crônicas, Músculo esquelético, Trofismo Muscular

Key words: Myostatin, Chronic diseases, Skeletal Muscle, Muscle trophism

INTRODUÇÃO

Em doenças crônicas, a perda de massa muscular esquelética é um problema de considerável importância clínica porque está associada a debilidade, piora da qualidade de vida e redução da sobrevivência¹⁻⁵. Os mecanismos responsáveis pela perda da massa muscular em doenças crônicas ainda não estão bem definidos. Diversos fatores parecem estar envolvidos como redução na atividade física e neuromuscular, diminuição do peso corporal com perda de massa magra, ativação neurohormonal e aumento da concentração sérica de citocinas inflamatórias⁶⁻⁸.

Em meados da década de 90, foi descoberta a miostatina, proteína também conhecida como fator de crescimento e diferenciação-8 (GDF-8)⁹. A miostatina regula o crescimento de músculos esqueléticos durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta. Estudos experimentais sobre seu papel fisiológico mostraram correlação negativa entre expressão da miostatina e massa muscular¹⁰. Mais recentemente, foi sugerido por vários pesquisadores que a miostatina pode estar envolvida na redução da musculatura esquelética frequentemente observada em pacientes com doenças crônicas^{2,11,12}.

Nesta revisão, será apresentado um histórico da miostatina, bem como as características desta proteína e seus antagonistas, um resumo de estudos experimentais sobre seu papel em condições fisiológicas e patológicas, e resultados dos poucos trabalhos clínicos que avaliaram a miostatina em humanos. Finalmente, serão descritas

as perspectivas para o futuro com antagonistas da miostatina para impedir ou reverter a perda patológica de massa muscular.

HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS DA MIOSTATINA

A miostatina foi descoberta, em 1997, em pesquisas para identificar novos membros da superfamília TGF- β (fator transformador do crescimento-beta) de fatores de diferenciação e crescimento celular^{10,13}. A miostatina difere das outras proteínas da superfamília TGF- β por ser expressa quase que exclusivamente na musculatura esquelética¹⁰. Embora sua expressão possa ser detectada em todos os músculos, é preferencialmente encontrada em músculos com predomínio de fibras rápidas em detrimento daqueles com predomínio de fibras lentas¹⁴. Expressão gênica da proteína também foi observada no tecido adiposo¹⁰.

O gene da miostatina, constituído por três éxons e dois íntrons, localiza-se na região cromossomal 2q33.2. O gene é transcrito como mRNA de 3,1 kb que codifica um precursor de 375 aminoácidos¹. A miostatina circula no sangue associada a um propeptídeo, em forma de complexo latente. O complexo propeptídeo-miostatina sofre clivagens proteolíticas e dissociações para a liberação da miostatina, que é o componente ativo^{10,15,16}. A atividade da miostatina pode ser inibida por diferentes proteínas como a folistatina, os genes relacionados à folistatina (FLRG), os fatores de crescimento e diferenciação associados à proteína-I plasmática (GASP-I), e o próprio propeptídeo com o qual forma complexo circulante^{10,15,16}. Há evidências que a folistatina seja um dos principais antagonistas da miostatina¹⁷. A folistatina é expressa em vários tecidos e atua como antagonista de diferentes membros da família TGF- β ¹⁸. Quando sua expressão encontra-se aumentada, ocorre inibição do processo de atrofia muscular ativado pela miostatina¹⁹.

A miostatina está envolvida, principalmente, na inibição do crescimento e da regeneração de músculos esqueléticos. Apesar da miostatina aparentemente não ser essencial para a viabilidade ou fertilidade, seu gene codificante e sua função têm sido bem conservados durante a evolução: humanos, porcos, perus, galinhas e ratos possuem seqüências protéicas de miostatina idênticas no terminal carboxil (COOH) biologicamente ativo da molécula²⁰. Além de seus efeitos sobre células musculares, parece atuar também como regulador da adipogênese²¹.

Durante períodos de crescimento e/ou regeneração muscular, células precursoras miogênicas quiescentes, entre as quais, as células mio-satélites, são ativadas. Estas apresentam a função de proliferação e diferenciação e os núcleos podem diferenciar-se em novos mionúcleos e ser incorporados à fibra pré-existente, ou reparar a fibra muscular lesada²². O processo de ativação, proliferação e diferenciação das células mio-satélites é regulado, em parte, pelos fatores de regulação miogênica MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4²³. A deficiência na proliferação e diferenciação das células mio-satélites dificulta a regeneração e induz atrofia muscular. Estudos sugerem que a miostatina inibe a expressão dos fatores regulatórios músculo específicos, principalmente MyoD e miogenina^{23,24}, e leva a deficiência na proliferação e diferenciação de células mio-satélites com consequente atrofia muscular²⁴. A redução no crescimento celular causada pela miostatina não parece ser dependente de indução de apoptose na fibra muscular²⁵.

A sinalização intracelular decorrente da estimulação pela miostatina ainda não está completamente definida. Estudos sugerem que a miostatina interage com os receptores de membrana activina tipo II (Act RII e Act RIIB) e, em menor intensidade, com o receptor Act RIIA^{10,17,26}. Em cultura de mioblastos, a adição de miostatina promove bloqueio da miogênese pela regulação negativa na expressão do fator transcricional pax3 e consequente inibição na expressão da MyoD²⁴. Além disso, a miostatina induz aumento na degradação de proteínas musculares por meio de ativação do sistema proteolítico da

ubiquitina e de outros sistemas proteolíticos. A degradação protéica é mediada, em parte, por hipofosforilação da FoxO1, por inibição da sinalização pela via PI3K/AKT, e por estimulação da atrogina e outros genes relacionados à atrofia muscular²⁴. Finalmente, há evidências que a indução da perda de massa muscular ocorre independentemente da via do NF- κ B²⁴.

ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Há cerca de 200 anos, sabe-se que há uma linhagem do gado Belgian Blue que apresenta musculatura exageradamente desenvolvida. Estudos realizados após a descoberta da miostatina mostraram a presença de mutações na seqüência de nucleotídicos da miostatina, tornando-a candidata para o crescimento excessivo da massa muscular em linhagens desse gado^{10,13}.

Os efeitos da miostatina sobre a composição corporal e as bases moleculares de sua sinalização foram elucidados a partir de estudos experimentais utilizando, principalmente, camundongos transgênicos. Em camundongos, o aumento da miostatina circulante induz perda severa de massa muscular e tecido adiposo, semelhantemente ao que se observa nas síndromes de caquexia humana^{7,20,24}. Por outro lado, em camundongos com deleção do gene da miostatina, observa-se aumento do número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia) das fibras musculares¹³, sugerindo que a miostatina regula o número de fibras durante o período embrionário e o crescimento muscular no período pós-natal. Como animais heterozigotos para o gene também apresentam alterações musculares, porém de forma branda, foi sugerido que as ações da miostatina são dependentes de sua concentração¹⁰. A deleção do gene da miostatina foi acompanhada, também, por menor acúmulo de gordura. Este fato pode ser decorrente de ação direta na adipogênese²¹ e/ou do aumento da massa muscular, já que efeitos

similares são observados em outros modelos genéticos de hipertrofia muscular¹⁴. Finalmente, a inibição farmacológica da miostatina por anticorpo monoclonal causa hipertrofia e aumento da força muscular em camundongos adultos ou idosos, sem alterar o tamanho ou a morfologia de órgãos como rins, fígado e coração¹⁴. Hipertrofia muscular também foi observada após bloqueio da miostatina por forma solúvel do receptor ActRIIB²⁶ ou por mutações na forma do propeptídeo da miostatina, resistente aos indutores de clivagem²⁸.

Em situações fisiológicas, observou-se que o treinamento físico induz redução na expressão gênica da miostatina²⁹⁻³¹. Por outro lado, a miostatina não parece estar envolvida na atrofia relacionada à idade³⁰.

O papel da miostatina também tem sido avaliado, experimentalmente, em várias condições patológicas como insuficiência cardíaca, neoplasias, cirrose, distrofias musculares, uremia e denervação^{19,32-37}.

Há grande interesse em avaliar o papel da miostatina na perda de massa muscular associada à insuficiência cardíaca crônica. Nesta condição, ocorrem diversas alterações da musculatura esquelética como atrofia, fibrose, redução da função contrátil e alterações da expressão dos fatores de regulação miogênica³⁸⁻⁴⁴. Os mecanismos responsáveis pelas anormalidades musculares na insuficiência cardíaca ainda não estão completamente definidos. Recentemente, foi observado aumento na expressão protéica da miostatina no músculo gastrocnêmio de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio³⁵. Em nosso laboratório, verificamos que ratos com insuficiência cardíaca crônica apresentam atrofia do músculo sóleo na ausência de alterações da expressão gênica e protéica da miostatina. Entretanto, a expressão protéica da folistatina foi reduzida. Como a folistatina é antagonista da miostatina, sua redução pode ter colaborado para aumentar a atividade da miostatina e induzir atrofia muscular³².

Severa perda de massa muscular pode ser observada em associação a neoplasias³³. Em estudos experimentais com indução de tumor em ratos, foi verificado aumento significativo na expressão gênica e protéica da miostatina³³. Também na cirrose hepática, em ratos, atrofia muscular foi acompanhada por aumento da expressão da miostatina e prejuízo de função das células mio-satélites³⁴. Da mesma forma, ratos com uremia³⁶, denervação³⁷, ou sob tratamento com glicocorticóide⁴⁵ apresentaram aumento da expressão da miostatina.

As distrofias musculares constituem outro importante campo de estudo para avaliar o papel da miostatina na manutenção e perda de massa muscular. A distrofia muscular de Duchenne é uma doença degenerativa associada ao cromossomo X e causada por mutações na distrofina¹⁹. Em modelo experimental simulando distrofia de Duchenne em camundongos, a inibição da miostatina resultou em fenótipo com miofibrilas maiores e mais uniformes, menor infiltrado de células mononucleares e redução de fibrose e da concentração sérica de creatina quinase^{19,46,47}. Além disso, houve melhora da força muscular avaliada tanto *in vivo* como *in vitro*^{19,46}. Entretanto, os animais tratados apresentaram menor resistência à atividade aeróbica⁴⁶. Esses resultados mostram o potencial papel do bloqueio da miostatina na perda da massa muscular na distrofia de Duchenne.

Em resumo, os estudos experimentais realizados em diversas condições patológicas mostram que a miostatina pode exercer importante papel na perda de massa muscular associada a doenças crônicas. Além disso, sugerem o potencial benefício de inibidores da miostatina e/ou de estimuladores de seus antagonistas para a prevenção e tratamento desta condição.

ESTUDOS CLÍNICOS

Até o momento, poucos estudos avaliaram o comportamento da miostatina em indivíduos saudáveis e em pacientes com doenças crônicas associadas a perda de massa muscular. Em homens hígidos, a expressão gênica da miostatina no músculo esquelético foi semelhante entre jovens e idosos⁴⁸, enquanto sua concentração sérica foi menor em idosos do que em jovens⁴⁹. Além disso, ao contrário do que seria esperado, a administração de testosterona promoveu aumento transitório da miostatina, que retornou aos níveis basais após 20 semanas de tratamento⁴⁹. Estes resultados sugerem que a miostatina possa atuar como um hormônio contra-regulador para refrear o crescimento muscular em resposta a estímulos anabólicos⁴⁹.

Em homens com AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) e perda de peso, foi observado aumento das concentrações sérica e muscular de miostatina e correlação inversa entre concentração de miostatina e massa magra do corpo¹. Em pacientes com distrofia muscular de Duchenne, foi observado que a concentração sérica de miostatina pode ser muito variável; cerca de 25% dos doentes avaliados tiveram valores considerados normais e o restante da amostra apresentou concentração discreta ou grandemente elevada⁵⁰. Assim, os autores sugerem cautela ao avaliar os efeitos do bloqueio da miostatina nessa doença porque é possível que este possa ser efetivo apenas nos casos que apresentem aumento de sua concentração sérica⁵⁰.

Para promover inibição da miostatina, em humanos, o único fármaco disponível é o anticorpo anti-miostatina, denominado MYO-029, atualmente em avaliação em estudos clínicos fases I e II^{51,52}. Em estudo multicêntrico, duplo cego, controlado por placebo, a administração de MYO-029 para pacientes com distrofias musculares foi segura e com razoável tolerabilidade⁵¹. Os resultados preliminares encorajaram estudos clínicos

utilizando este e outros inibidores da miostatina em condições clínicas associadas a perda de massa muscular.

Em oposto aos estudos apresentados, sobre o papel da miostatina na redução da massa muscular, há relato de caso associando a deficiência de miostatina a importante hipertrofia muscular. Trata-se de criança que apresentou hipertrofia de músculos esqueléticos detectada ao nascimento⁵³. Durante a investigação, foi observada mutação e perda de função no gene da miostatina. Na época da publicação, a criança estava com 4,5 anos de idade, tinha músculos esqueléticos muito desenvolvidos, mas não apresentava problemas de saúde. Essa ocorrência indica que, em humanos, a inibição da miostatina pode acarretar efeitos similares àqueles observados nos estudos com camundongos transgênicos.

PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

Diversas pesquisas têm sido realizadas focando, principalmente, no método mais efetivo e seguro para bloquear a sinalização da miostatina *in vivo* e, conseqüentemente, promover aumento da massa e força muscular. Entre as possibilidades terapêuticas, ainda em fase de investigação experimental, incluem-se anticorpos monoclonais anti-miostatina^{14,51,52}, propeptídeo da miostatina⁴⁶, forma solúvel do receptor activina tipo IIB²⁶ e folistatina¹⁹.

Curiosamente, pesquisa no Google com as palavras “myostatin blocker” leva ao aparecimento de milhares de citações, a maioria delas em sites de suplementos alimentares ou relacionados à boa forma física, que fazem alarde aos poderes dos bloqueadores da miostatina para aumentar a massa muscular em pessoas saudáveis. Os estudos em andamento abrem a perspectiva para o encontro de fármaco que promova tratamento direcionado especificamente à perda de massa muscular associada a doenças

crônicas. Entretanto, é importante salientar que vários aspectos relacionados ao bloqueio crônico da miostatina necessitam ser cuidadosamente definidos em protocolos experimentais e, posteriormente em humanos, antes de estabelecer indicações para o uso de inibidores da miostatina.

REFERÊNCIAS

1. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Hikim IS, Ma K, Ezzat S, et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:14938-43.
2. Bruera E, Sweeney C. Cachexia and asthenia in cancer patients. *Lancet*. 2000;1:138-47.
3. Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, et al. Wasting as independent risk factor of mortality in chronic heart failure. *Lancet*. 1997;349:1050-3.
4. Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, Paiva SAR, Cicogna AC. Tratamento da caquexia associada à insuficiência cardíaca. *Rev Bras Clín Terap*. 2000;26:98-101.
5. Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, Paiva SAR, Cicogna AC. Caquexia em insuficiência cardíaca. *Rev Bras Med*. 2001;58:742-9.
6. Martinez PF, Okoshi K, Carvalho RF, Campos DHS, Damatto RL, Lima ARR, et al. Miopatia associada à insuficiência cardíaca crônica. *Rev Soc Bras Clin Med*. 2007;5:203-10.
7. Morley JE, Thomas DR, Wilson M-MG. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:735-43.
8. Lynch GS, Schertzer JD, Ryall JG. Therapeutic approaches for muscle wasting disorders. *Pharmacol Ther*. 2007;113:461-87.
9. McPherron AC, Lawler AM, Lee S-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997;387:83-90.
10. Lee S-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:61-86.

11. Baumann AP, Ibebunjo C, Grasser WA, Paralkar VM. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003;3:8-16.
12. Jespersen J, Kjaer M, Schjerling P. The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;16:74-82.
13. McPherron AC, Lee S-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:12457-61.
14. Whittemore L-A, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;291:701-6.
15. Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, et al. The myostatin propeptide and follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem.* 2002;277:40735-41.
16. Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol.* 2003;17:1144-54.
17. Lee S-J, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9306-11.
18. Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, et al. Follistatin complexes myostatin and antagonises myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol.* 2004;270:19-30.
19. Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, et al. Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J.* 2008;22:477-87.

20. Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*. 2002;296:1486-8.
21. Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol*. 2003;23:7230-42.
22. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84:209-38.
23. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem*. 2002;277:49831-40.
24. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through a NF- κ B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2006;209:501-14.
25. Dominique J-E, Gerard C. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res*. 2006;312:2401-14.
26. Lee S-J, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, et al. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:18117-22.
27. Girgenrath S, Song K, Whittemore L-A. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 2005;31:34-40.
28. Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, et al. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15842-6.

29. Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, Haddad F, Langberg H, Baldwin KM, et al. Short-term strength training and the expression of myostatin and IGF-I isoforms in rat muscle and tendon: differential effects of specific contraction types. *J Appl Physiol*. 2006;102:573-81.
30. Kawada S, Tachi C, Ishii N. Content and localization of myostatin in mouse skeletal muscles during aging, mechanical unloading and reloading. *J Muscle Res Cell Motil*. 2001;22:627-33.
31. Matsakas A, Bozzo C, Cacciani N, Caliaro F, Reggiani C, Mascarello F, et al. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. *Exp Physiol*. 2006;91:983-94.
32. Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, et al. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path*. 2009; in press.
33. Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, Penna F, Reffo P, Bossola M, et al. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:531-8.
34. Dasarathy S, Dodig M, Muc SM, Kalhan SC, McCullough AJ. Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastomosis rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:G1124-G30.
35. Lenk K, Schur R, Linke A, Erbs S, Matsumoto Y, Adams V, et al. Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *Eur J Heart Fail*. 2009;11:342-8.
36. Sun DF, Chen Y, Rabkin R. Work-induced changes in skeletal muscle IGF-1 and myostatin gene expression in uremia. *Kidney Int*. 2006;70:453-9.

37. Zhang D, Liu M, Ding F, Gu X. Expression of myostatin RNA transcript and protein in gastrocnemius muscle of rats after sciatic nerve resection. *J Muscle Res Cell Motil.* 2006;27:37-44.
38. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF, Padovani CR, Okoshi MP, et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Path.* 2003;84:201-6.
39. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugisaki MM, Nogueira CR, et al. Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Path.* 2006;87:219-25.
40. Carvalho RF, Dariolli R, Justulin Jr LA, Sugizaki MM, Okoshi MP, Cicogna AC, et al. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol.* 2006;87:437-43.
41. Lopes FS, Carvalho RF, Campos GER, Sugizaki MM, Padovani CR, Nogueira CR, et al. Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *Int J Exp Path.* 2008;89:216-22.
42. Coirault C, Guellich A, Barbry T, Samuel JL, Riou B, Lecarpentier Y. Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1009-H117.
43. Damatto RL, Cezar MDM, Martinez PF, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Lima ARR, et al. Caracterização das alterações musculares esqueléticas em ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93:125.
44. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Campos DHS, et al. Myogenic regulatory factors expression in skeletal muscle changes during ventricular dysfunction and heart failure. *Circulation.* 2008;117:209-10.

45. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285:E363-E71.
46. Qiao C, Li J, Jiang J, Zhu X, Wang B, Li J, et al. Myostatin propeptide gene delivery by adeno-associated virus serotype 8 vectors enhances muscle growth and ameliorates dystrophic phenotypes in mdx mice. *Hum Gene Ther.* 2008;19:241-54.
47. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittmore LA, Ahima RS, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* 2002;420:418-21.
48. Welle S, Bhatt K, Shah B, Thornton C. Insulin-like growth factor-1 and myostatin mRNA expression in muscle: comparison between 62-77 and 21-31 yr old men. *Exp Gerontol.* 2002;37:833-9.
49. Lakshman KM, Bhasin S, Corcoran C, Collins-Racie LA, Tchistiakova L, Forlow SB, et al. Measurement of myostatin concentrations in human serum: Circulating concentrations in young and older men and effects of testosterone administration. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302:26-32.
50. Awano H, Takeshima Y, Okizuka Y, Saiki K, Yagi M, Matsuo M. Wide ranges of serum myostatin concentrations in Duchenne muscular dystrophy patients. *Clin Chim Acta.* 2008;391:115-7.
51. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, et al. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2008;63:561-71.
52. Krivickas LS, Walsh R, Amato AA. Single muscle fiber contractile properties in adults with muscular dystrophy treated with MYO-029. *Muscle Nerve.* 2009;39:3-9.

53. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.* 2004;350:2682-8.