

Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas*

Myostatin and muscle mass in chronic diseases

Daniele Mendes Guizoni¹, Aline Regina Ruiz Lima¹, Paula Felipe Martinez¹, Ricardo Luiz Damatto¹, Marcelo Diarcádia Mariano Cezar¹, Camila Bonomo¹, Katashi Okoshi², Maeli Dal Pai-Silva³, Marina Politi Okoshi²

*Recebido da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP.

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: A miostatina, também conhecida como fator de crescimento e diferenciação-8 (GDF-8), regula o crescimento de músculos esqueléticos durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta. Foi descoberta em pesquisas para identificar novos membros da superfamília fator transformador do crescimento- β (TGF- β) de fatores de diferenciação e crescimento celular. Os objetivos deste estudo consistiram em descrever o histórico e as características da miostatina, resumo de estudos sobre mecanismo de ação em condições fisiológicas e patológicas, por meio de estudos em humanos e modelos experimentais em animais, bem como as perspectivas futuras de utilização terapêutica de antagonistas da miostatina.

CONTEÚDO: Estudos sobre os efeitos da miostatina mostraram correlação negativa entre sua expressão e massa muscular, sugerindo que possa estar envolvida na indução de hipotrofia e inibição do crescimento da musculatura esquelética. O mecanismo de ação da miostatina também foi avaliado, experimentalmente, em várias doenças como insuficiência cardíaca, neoplasias, cirrose, distrofias musculares, uremia e denervação. Os resultados sugerem que a

miostatina exerce ações relevantes na redução da musculatura esquelética associada a estas condições. Também em humanos, os estudos realizados com indivíduos saudáveis e em pacientes com doenças crônicas reforçam este conceito. Entre as perspectivas para o futuro, ainda em fase de investigação experimental, há possibilidades terapêuticas que permitam antagonizar a ação da miostatina e reverter ou impedir a perda de massa muscular associada a doenças crônicas. Entre elas incluem-se anticorpos monoclonais anti-miostatina, propeptídeo da miostatina resistente à clivagem, forma solúvel do receptor activina tipo IIB e follistatina.

CONCLUSÃO: Estudos clínicos e experimentais permitem vislumbrar a inibição da miostatina como opção terapêutica para distrofias musculares e doenças crônicas que evoluem com perda de massa muscular.

Descritores: Distrofia muscular, Doenças crônicas, Miostatina, Músculo esquelético, Trofismo muscular.

SUMMARY

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Myostatin, or GDF-8 (growth and differentiation factor-8), regulates muscle growth during development and adult life. Myostatin was originally identified in a screen for novel members of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily of growth and differentiation factors. In this short review we describe myostatin characteristics, summary of studies on myostatin during physiological and pathological settings in human and experimental animal's studies and future directions on myostatin antagonism.

CONTENTS: Studies about the myostatin effects have shown a negative correlation between myostatin expression and muscle mass suggesting its involvement on muscle growth inhibition and atrophy. Myostatin has also been experimentally evaluated in several diseases such as heart failure, cancer, cirrhosis, muscular dystrophy, uremia, and denervation. The results suggest that myostatin can play an important role on chronic disease-associated skeletal muscle wasting. Although human studies are sparse, evaluation performed in healthy individuals and chronically diseased

1. Pós-Graduando do Programa "Fisiopatologia em Clínica Médica" da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Botucatu, SP, Brasil
2. Professor Doutor do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Botucatu, SP, Brasil
3. Professora Adjunta do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu (UNESP). Botucatu, SP, Brasil

Apresentado em 28 de dezembro de 2009

Aceito para publicação em 25 de março de 2010

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Marina Politi Okoshi

Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Distrito de Rubião Júnior, s/n

18603-970 Botucatu, SP.

Fone: (14) 3882-2969 - Fax: (14) 3882-2238 - Cel: (14) 9792-8023

E-mail: mpoliti@fmb.unesp.br

© Sociedade Brasileira de Clínica Médica

patients reinforces this hypothesis. Considering future perspectives, there is therapeutic potential to inhibit myostatin activity and treat or prevent muscle loss associated with chronic diseases. This includes myostatin neutralizing antibodies, protease resistant form of the myostatin propeptide, soluble version of the activin RIIB receptor, and follistatin.

CONCLUSION: Experimental studies validate myostatin inhibition as a therapeutic approach to muscular dystrophy and chronic disease-associated muscle wasting.

Keywords: Chronic diseases, Muscle trophism, Muscular dystrophy, Myostatin, Skeletal muscle.

INTRODUÇÃO

Em doenças crônicas, a perda de massa muscular esquelética representa um achado de considerável importância clínica, porque se associam à debilidade, piora da qualidade de vida e menor sobrevivência¹⁻⁵. Os mecanismos responsáveis pela perda da massa muscular em doenças crônicas ainda não estão completamente esclarecidos. Diversos fatores parecem estar envolvidos como redução na atividade física e neuromuscular, diminuição do peso corporal com perda de massa magra, ativação neuro-hormonal e aumento da concentração sérica de citocinas inflamatórias⁶⁻⁸.

Em meados da década de 1990, 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 sua importância fisiológica mostraram correlação negativa entre expressão da miostatina e massa muscular¹⁰. Estudos recentes sugerem que a miostatina possa estar envolvida na redução da musculatura esquelética, frequentemente observada em pacientes com doenças crônicas^{2,11,12}.

Os objetivos deste estudo consistiram em apresentar o histórico e as características bioquímicas da miostatina e de seus antagonistas, resumo de estudos experimentais sobre seus mecanismos de ação em condições fisiológicas e patológicas, bem como os resultados de estudos clínicos que avaliaram as funções da miostatina em seres humanos. Finalmente, são abordadas as perspectivas terapêuticas futuras 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 de fatores de diferenciação e crescimento celular^{10,13}. Ela difere das outras proteínas da superfamília TGF- β por ser expressa quase que exclusivamente na musculatura esquelética¹⁰.

Estudos em ratos e camundongos mostraram que, embora sua expressão possa ser detectada em todos os músculos, é preferencialmente encontrada naqueles com predomínio de fibras rápidas em detrimento dos que apresentam predomínio de fibras lentas^{10,14}. 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 após clivagens proteolíticas e dissociação libera o componente ativo, a miostatina^{10,15,16}. A sua atividade pode ser inibida por diferentes proteínas como a follistatina, os genes relacionados à follistatina (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 de que a follistatina seja um dos principais antagonistas da miostatina¹⁷. A follistatina 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 preservados durante a evolução: humanos, porcos, perus, galinhas e ratos apresentam sequências proteicas de miostatina idênticas no terminal carboxil biologicamente ativo da molécula²⁰. Além dos efeitos sobre a musculatura, foi observado, em cultura de células-tronco mesenquimais, que a miostatina pode também atuar como reguladora da adipogênese²¹.

Durante os 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. Seus núcleos podem diferenciar-se em novos mio-núcleos e incorporar-se à fibra pré-existente ou reparar lesões da fibra muscular²². O processo de ativação, proliferação e diferenciação das células mio-satélites é regulado, em parte, pelos fatores de regulação miogênica MyoD, miogenina, *myogenic factor 5* (Myf5) e *myogenic regulatory factor 4* (MRF4)²³. A deficiência na proliferação e diferenciação das células mio-satélites dificulta a regeneração e promove atrofia muscular. Estudos sugerem que a miostatina inibe a expressão dos fatores regulatórios músculos-específicos, principalmente MyoD e miogenina^{23,24}, além de levar à deficiência na proliferação e diferenciação de células mio-satélites com consequente atro-

fia 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 elucidada. Estudos sugerem que a miostatina interage com os receptores de membrana activina tipo II B (ActRIIB) e, em menor intensidade, com o receptor Act IIA^{10,17,26}. Em cultura de mioblastos, a adição de miostatina promove bloqueio da miogênese pela regulação negativa na expressão do fator transcricional *paired box 3* (pax3) e consequente inibição na expressão da MyoD²⁴. Além disso, a miostatina promove 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 *forkhead box O1* (FoxO1), por inibição da sinalização pela via fosfoinositol-3-quinase (PI3K)/proteína quinase serina/treonina (AKT), e por estimulação da atrogina e outros genes relacionados à atrofia muscular (Figura 1)²⁴. Finalmente, há evidências de que a indução da perda de massa muscular ocorre independentemente da via do fator nuclear kappa B (NF-β)²⁴.

ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Há cerca de 200 anos, sabe-se que existe uma linhagem de gado *Belgian Blue* que apresenta musculatura exageradamente desenvolvida. Estudos realizados após a descoberta da miostatina mostraram a presença de mutações na sequência de nucleotídeos da miostatina, tornando-a responsável pelo crescimento excessivo da massa muscular em suas linhagens^{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 ocasiona perda intensa de massa muscular e tecido adiposo, de forma semelhante 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 musculares⁹, 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 é 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 de ratos e camundongos promove redução na expressão gênica da miostatina²⁹⁻³¹. Por outro lado, em camundongos, a miostatina não parece estar envolvida na atrofia relacionada à idade³⁰.

As ações da miostatina também têm sido estudadas, experimentalmente, em várias condições patológicas como insuficiência cardíaca, neoplasias, cirrose, distrofias musculares, uremia e denervação^{19,32-37}.

Os mecanismos responsáveis pelas anormalidades musculares na insuficiência cardíaca ainda não estão completamente elucidados. Nesta condição, ocorrem diversas alterações da musculatura esquelética como a atrofia, fibrose, redução da função contrátil e alterações na expressão dos fatores de regulação miogênica³⁸⁻⁴⁴. Recentemente, foi observado

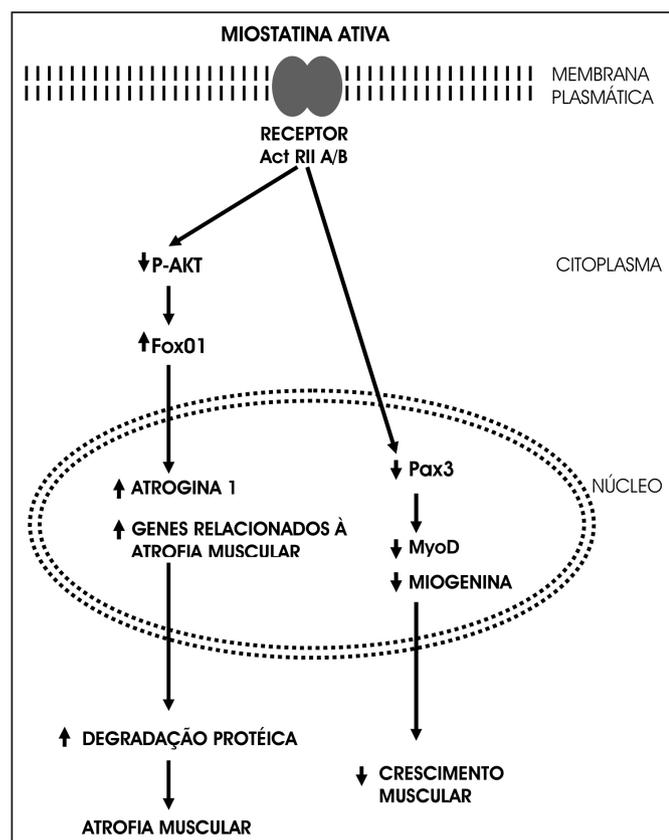


Figura 1 – Esquema ilustrativo mostrando as vias de sinalização intracelular da miostatina

Act RII A/B = activina tipo II A/B; AKT = proteína quinase serina/treonina; FoxO1 = *forkhead box O1*; Pax3 = *paired box 3*.

aumento na expressão protéica da miostatina no músculo gastrocnêmico de ratos com insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio³⁵. 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 reduzida³². Como a folistatina é antagonista da miostatina, sua redução pode ter colaborado para aumentar a atividade da miostatina e induzir atrofia muscular³².

Intensa 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 comprometimento da função das células miofibrilares³⁴. Da mesma forma, ratos com uremia³⁶, denervação³⁷, ou sob tratamento com glicocorticoide⁴⁵ apresentaram aumento da expressão da miostatina.

As distrofias musculares também têm sido estudadas com o objetivo de estabelecer a importância 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}. Apesar de menor resistência à atividade aeróbica⁴⁶, houve melhora da força muscular avaliada tanto *in vivo* como *in vitro*^{19,46}. Esses resultados mostraram o potencial papel do bloqueio da miostatina na perda da massa muscular em modelos experimentais em camundongos da distrofia de Duchenne.

Em resumo, os estudos experimentais em animais realizados em diversas condições patológicas mostram que a miostatina pode participar da redução da musculatura esquelética 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 da atrofia muscular.

ESTUDOS CLÍNICOS

Até o momento, é reduzido o número de estudos que avaliaram o comportamento da miostatina em indivíduos saudáveis e em pacientes com doenças crônicas. Em homens hígidos, a expressão gênica da miostatina no músculo esquelético foi semelhante entre jovens e idosos⁴⁸, enquanto sua concentração sérica foi menor em idosos⁴⁹. Além disso, 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 pode atuar como um hormônio contra-regulador para refrear o crescimento muscular em resposta a estímulos anabólicos⁴⁹.

Em homens com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e perda de peso, Gonzalez-Cadavid e col.¹ constataram aumento das concentrações sérica e muscular de miostatina e correlação inversa entre concentração de miostatina e massa magra do corpo. Em estudo com 42 casos de distrofia muscular de Duchenne, a concentração sérica de miostatina foi muito variável; 10 pacientes apresentaram valores considerados normais e o restante, concentração discreta ou acentuadamente elevada⁵⁰. Assim, os autores sugerem cautela ao avaliar os efeitos do bloqueio da miostatina nas distrofias musculares porque é possível que este possa ser efetivo apenas nos casos com aumento da concentração sérica de miostatina⁵⁰.

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, duplamente encoberto, controlado por placebo, a administração de MYO-029 para pacientes com distrofias musculares foi segura e apresentou razoável tolerabilidade⁵¹. Os resultados preliminares encorajaram estudos clínicos utilizando este e outros inibidores da miostatina em condições clínicas associadas à perda de massa muscular.

Acentuada hipertrofia muscular e deficiência de miostatina foi constatada em um relato de caso. Trata-se de criança que apresentou hipertrofia de músculos esqueléticos detectada ao nascimento⁵³. Durante a investigação, detectou-se mutação e perda de função no gene da miostatina. Na época da publicação, a criança estava com 4,5 anos de idade, apresentava-se com músculos esqueléticos muito desenvolvidos, porém hígida. 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 aproximadamente 3.070.000 citações, a maioria delas em portais de suplemen-

tos alimentares ou relacionados à melhora da capacidade física, que apresentam mecanismos potenciais dos bloqueadores da miostatina para aumentar a massa muscular de pessoas saudáveis. Os estudos em andamento abrem a perspectiva para a obtenção de fármacos que possam ser prescritos no tratamento da 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.

CONCLUSÃO

Embora recentemente descoberta, a miostatina despertou o interesse de pesquisadores em áreas afins. Suas propriedades, ainda não completamente elucidadas, sugerem que possa atuar na regulação da massa muscular esquelética, tanto no desenvolvimento embrionário quanto na vida adulta. Estudos clínicos e experimentais sugerem que a inibição da miostatina possa representar opção terapêutica na preservação ou recuperação da massa muscular de pacientes com doenças crônicas que evoluem com perda muscular.

REFERÊNCIAS

- Gonzalez-Cadavid NE, Taylor WE, Yarasheski K, 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(25):14938-43.
- Bruera E, Sweeney C. Cachexia and asthenia in cancer patients. *Lancet Oncol* 2000 Nov; 1:138-47.
- Anker SD, Ponikowski P, Varney S, et al. Wasting as independent risk factor of mortality in chronic heart failure. *Lancet* 1997;349(9058):1050-53. [erratum in: *Lancet* 1997;349(9060):1258].
- Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, et al. Tratamento da caquexia associada à insuficiência cardíaca. *Rev Bras Clin Terap* 2000;26(3):98-101.
- Okoshi MP, Campana AO, Okoshi K, et al. Caquexia em insuficiência cardíaca. *Rev Bras Med* 2001;58:742-9.
- Martinez PF, Okoshi K, Carvalho RF, et al. Miopatia associada à insuficiência cardíaca crônica. *Rev Bras Clin Med* 2007;5(6):203-10.
- Morley JE, Thomas DR, Wilson MM. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr* 2006;83(4):735-43.
- Lynch GS, Schertzer JD, Ryall JG. Therapeutic approaches for muscle wasting disorders. *Pharmacol Ther* 2007;113(3):461-87.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997;387(6628):83-90.
- Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:61-86.
- Baumann AP, Ibebunjo C, Grasser WA, et al. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2003;3(1):8-16.
- Jespersen J, Kjaer M, Schjerling P. The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scand J Med Sci Sports* 2006;16(2):74-82.
- McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(23):12457-61.
- Whittemore LA, Song K, Li X, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(4):965-71.
- Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 2002;277(43):40735-41.
- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, et al. 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(6):1144-54.
- Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(16):9306-11.
- Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, et al. Follistatin complexes myostatin and antagonises myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol* 2004;270(1):19-30.
- Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, 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(2):477-87.
- Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 2002;296(5572):1486-8.
- Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, et al. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol* 2003;23(20):7230-42.
- Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004;84(1):209-38.
- Langley B, Thomas M, Bishop A, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 2002;277(51):49831-40.
- McFarlane C, Plummer E, Thomas M, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2006;209(2):501-14.
- Jouliia-Ekaza D, Cabello G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res* 2006;312(13):2401-14. [erratum in: *Exp Cell Res* 2006;312(17):3458].
- Lee SJ, Reed LA, Davies MV, et al. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(5):18117-22.
- Girgenrath S, Song K, Whittemore LA. 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(1):34-40.

28. Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, et al. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(26):15842-6.
29. Heinemeier KM, Olesen JL, Schjerling P, 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* 2007;102(2):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(8):627-33.
31. Matsakas A, Bozzo C, Cacciani N, et al. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. *Exp Physiol* 2006;91(6):983-94.
32. Lima AR, Martinez PF, Okoshi K, et al. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Pathol* 2010;91(1):54-62.
33. Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, et al. Muscle myostatin signaling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest* 2008;38(7):531-8.
34. Dasarathy S, Dodig M, Muc SM, et al. 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(6):G1124-30.
35. Lenk K, Schur R, Linke A, 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(4):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(3):453-9.
37. Zhang D, Liu M, Ding F, et al. Expression of myostatin RNA transcript and protein in gastrocnemius muscle of rats after sciatic nerve resection. *J Muscle Res Cell Motil* 2006;27(1):37-44.
38. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Pathol* 2003;84(4):201-6.
39. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, et al. Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol* 2006;87(3):219-25.
40. Carvalho RF, Dariolli R, Justulin Junior LA, et al. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol* 2006;87(6):437-43.
41. Lopes Fda S, Carvalho RF, Campos GE, et al. Down-regulation of MyoD gene expression in rat diaphragm muscle with heart failure. *Int J Exp Pathol* 2008;89(3):216-22.
42. Coirault C, Guellich A, Barbry T, et al. Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292(2):H1009-17.
43. Damatto RL, Cezar MDM, Martinez PF, et al. Caracterização das alterações musculares esqueléticas em ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 2009;93(3 Suppl 1):125.
44. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, et al. Myogenic regulatory factor expression in skeletal muscle changes during ventricular dysfunction and heart failure. *Circulation* 2008;117(Suppl 9):209-10.
45. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285(2):E363-71.
46. Qiao C, Li J, Jiang 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(3):241-54.
47. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002;420(6914):418-21.
48. Welle S, Bhatt K, Shah B, et al. 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(6):833-9.
49. Lakshman KM, Bhasin S, Corcoran C, 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(1):26-32.
50. Awano H, Takeshima Y, Okizuka Y, et al. Wide ranges of serum myostatin concentrations in Duchenne muscular dystrophy patients. *Clin Chim Acta* 2008;391(1):115-7.
51. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, et al. A phase I/II-trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2008;63(5):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(1):3-9.
53. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 2004;350(26):2682-8.