

Andréa Ferian

**Efeito da suplementação de leucina na
sinalização da via da miostatina durante
atrofia muscular esquelética**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot

Versão Corrigida: a versão original encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

RESUMO

FERIAN, A. **Efeito da suplementação de leucina na sinalização da via da miostatina durante atrofia muscular esquelética**. 2015. 65 f. Dissertação de Mestrado (Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O tecido muscular esquelético é altamente especializado na geração de tensão e desempenha funções essenciais em nosso organismo, como fixação e mobilidade do esqueleto, retorno venoso, respiração e termogênese. A massa do músculo esquelético é importante para a sua função, sendo regulada por diversos fatores, como estresse mecânico e sobrecarga hormonal. O processo de atrofia é definido como a perda do conteúdo proteico muscular e tem grande impacto na saúde e qualidade de vida. Por isso, existe atualmente um grande esforço na compreensão da regulação da massa muscular e na identificação de agentes que possam combater o processo atrofico. Estudos em nosso laboratório demonstraram que ratos imobilizados que receberam leucina, um aminoácido essencial que tem o início do seu metabolismo no músculo esquelético, apresentaram atenuação da diminuição da área de secção transversal em fibras do tipo I, via diminuição da expressão de atrogenes (inibição via ubiquitina-proteassoma). Apesar desses achados, os mecanismos celulares pelos quais a leucina atenua a perda de massa ainda não são totalmente elucidados. Nosso objetivo foi investigar o efeito da suplementação de leucina na via intracelular acionada por miostatina em um modelo de atrofia gerada por imobilização em ratos. A miostatina é um fator notoriamente atrofico, estando superexpressa em diversas situações fisiopatológicas que envolvem a perda de massa muscular, como câncer, sepsis, envelhecimento, entre outras. Ela atua estimulando a principal via proteolítica do músculo esquelético, o sistema ubiquitina-proteassoma. Nossa hipótese inicial contemplava que a expressão de miostatina se elevaria com a imobilização e que a leucina poderia atenuar esse aumento. No entanto, nossos resultados mostraram surpreendentemente uma forte regulação gênica no sentido de suprimir a via da miostatina na atrofia causada por imobilização. A suplementação com leucina associada à imobilização também provocou forte queda da expressão gênica de miostatina. Apesar da diminuição nos níveis de mRNA de miostatina, sua expressão proteica permaneceu inalterada. Em contrapartida, a folistatina, inibidor endógeno da miostatina, apresentou acentuado aumento da expressão gênica no grupo imobilizado e imobilizado/suplementados com leucina. Este último grupo também apresentou elevação na expressão proteica de folistatina. Nossos resultados mostraram que o efeito protetor da leucina no modelo atrofico utilizado não se dá através da sinalização da miostatina. Além disso, os dados sugerem uma resposta biológica coordenada entre o ligante, miostatina, e seu inibidor endógeno, a folistatina.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Atrofia. Imobilização. Miostatina. Leucina. Folistatina

ABSTRACT

FERIAN, A. **Effect of leucine supplementation upon myostatin pathway during skeletal muscle atrophy**. 2015. 65 p. Masters thesis (Morphofunctional Science) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Skeletal muscle is highly specialized in tension generation and its contractile function is essential for skeleton stabilization and mobility, venous return, breathing and thermogenesis. Muscle mass is crucial for its function and is regulated by many factors such as mechanical stress and hormonal stimulation. Importantly, the atrophic process consists in protein loss of muscle fibers and is triggered by several conditions such as sepsis, neurological disorders and disuse among others. Muscle mass loss has a large impact in health and quality of life and therefore there is currently a big effort in order to understand muscle mass regulation and also to identify elements that can mitigate muscle atrophy. Previous studies in our laboratory showed that immobilized rats that received leucine, an essential aminoacid, had attenuated loss of cross sectional area in type I fibers, by minimizing the increase in atrogenes expression. Despite of these findings, the cellular mechanisms whereby leucine attenuates muscle lost remain poorly understood. In this study, our purpose was to investigate the effect of leucine supplementation upon the myostatin pathway in an atrophic model driven by immobilization in rats. Myostatin, a member of TGF β superfamily, is a well-known atrophic factor by stimulating the ubiquitin-proteasome system. Myostatin is overexpressed in many pathophysiological conditions involving muscle loss such as cancer, AIDS, aging, among others. Our initial hypothesis contemplated that myostatin expression would be elevated under immobilization and that leucine supplementation would be able to attenuate this raise. However our results surprisingly showed a strong downregulation of myostatin gene expression in atrophy induced by cast. The immobilization associated with leucine supplementation also caused mRNA myostatin downregulation. Despite of the reduction in myostatin mRNA levels, protein levels were unchanged. On the other hand, follistatin, a myostatin endogenous inhibitor, was markedly upregulated in both immobilized and immobilized/supplemented groups. This last one showed also an increase in follistatin protein levels. Our results revealed that leucine protective effect in this atrophic model is not through myostatin signalling. Furthermore, these data suggest a coordinated biological response between ligand, myostatin, and its endogenous inhibitor, follistatin.

Keywords: Skeletal muscle. Atrophy. Immobilization. Myostatin. Leucine. Follistatin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Tecido Muscular Estriado Esquelético

O tecido muscular esquelético é o mais abundante do corpo humano e compreende entre de 40% a 60% de toda a massa corporal. Ele é altamente especializado na geração de tensão, sendo constituído por células alongadas e multinucleadas, que variam de 10 a 100 micrômetros de diâmetro e podem chegar a vários centímetros de comprimento. Cada célula corresponde a uma fibra muscular. A localização dos núcleos é periférica, junto à membrana plasmática ou sarcolema. Seu citoplasma é preenchido por filamentos proteicos dispostos longitudinalmente, as miofibrilas. Essas são formadas principalmente por proteínas denominadas actina e miosina, as quais conferem capacidade contrátil ao músculo (JUNQUEIRA, 2004; LIEBER, 2002). Essa propriedade contrátil do músculo esquelético está relacionada com diversas funções no organismo, como mobilidade do esqueleto, manutenção postural, retorno venoso, movimentação do globo ocular, respiração e termogênese.

Além disso, o músculo esquelético também exerce importante papel no metabolismo, como por exemplo, armazenando glicogênio e desempenhando um papel de reservatório proteico que é solicitado em condições de extrema demanda metabólica, como no câncer e durante privação alimentar (LIEBER, 2002).

Durante o desenvolvimento embrionário, pode-se distinguir duas fases na formação do tecido muscular esquelético: a primeira fase, denominada fase proliferativa, é caracterizada pela multiplicação dos mioblastos, que são células precursoras musculares, através de divisão mitótica; na segunda, denominada fase de diferenciação, os mioblastos fundem-se em pequenas células multinucleadas conhecidas como miotubos primários. Posteriormente, o comprimento dos miotubos aumenta pela fusão de mais mioblastos em sua porção final, dando origem aos miotubos secundários. Estes começam a se maturar com os núcleos sendo forçados para a periferia à medida que o interior da fibra é preenchido com as proteínas contráteis, dando origem a fibra muscular madura (LIEBER, 2002).

Os filamentos contráteis das fibras musculares esqueléticas maduras se organizam de tal forma que, ao microscópio óptico, notam-se estriações transversais. Essas estriações aparecem pelo fato de existir repetição de unidades iguais, denominadas sarcômeros. Os sarcômeros são compostos por miofilamentos

finos (formados pelas proteínas actina, tropomiosina e troponina) e miofilamentos grossos (formados pela proteína miosina). No sarcômero, esses miofilamentos estão dispostos de forma apropriada, compondo áreas claras e escuras que se intercalam, formando todo um conjunto de bandas e linhas que, ao se repetirem por toda a extensão da fibra muscular, são responsáveis pelas estriações transversais visualizadas ao microscópio de luz (MOLINARO, 2010). A organização desses miofilamentos permite uma contração muscular mais vigorosa e sincronizada, à medida que a cabeça da miosina liga-se no filamento de actina, tracionando-o e produzindo força ativa com o encurtamento do sarcômero. Por isso, o sarcômero é conhecido como a unidade funcional (contrátil) do músculo. Vários sarcômeros conectados em série, por sua vez, formam as miofibrilas (JUNQUEIRA, 2004).

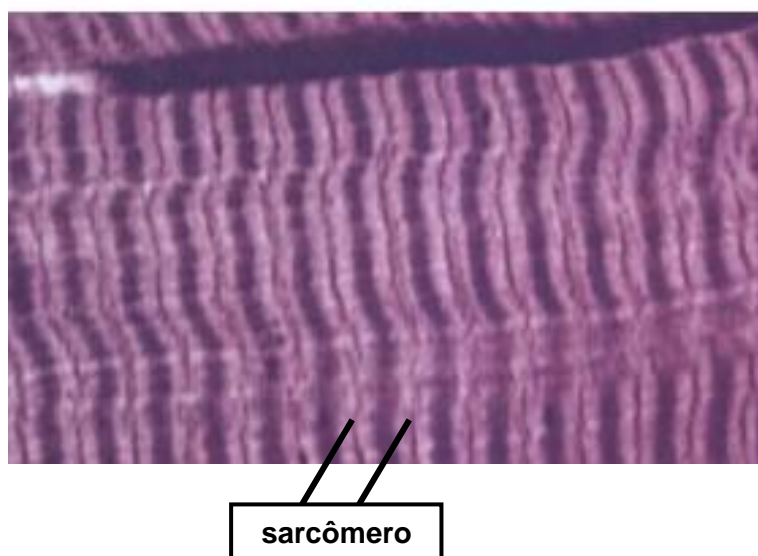


Figura 1. Corte longitudinal de fibras musculares esqueléticas ao microscópio óptico. As estriações transversais devem-se à repetição de unidades iguais, os sarcômeros (JUNQUEIRA, 2004)

Nos seres humanos podem ser distinguidos principalmente 3 tipos de fibras musculares: as fibras do tipo I (lentas), do tipo IIB (rápidas) e do tipo IIA (intermediárias). As fibras do tipo I possuem miosina de cadeia pesada do tipo I (MHCI), a qual possuem um baixo nível de atividade da enzima miosina ATPase e por isso excitam-se e contraem-se de forma mais lenta que as fibras do tipo IIB. No entanto, têm a capacidade de sustentar essa contração durante longos períodos de tempo e por isso são consideradas fibras de *endurance* ou resistência. Essas fibras

são consideradas vermelhas porque possuem maior capilarização e maior quantidade de mitocôndria e mioglobina, o que as faz serem mais eficientes em carrear o oxigênio; além disso, existe uma alta concentração de enzimas mitocondriais necessárias para sustentar o metabolismo aeróbico. Assim sendo, as fibras de contração lenta são resistentes à fadiga e apropriadas para o exercício aeróbico prolongado. Essas fibras foram também denominadas de LO (lentas oxidativas) para descrever sua velocidade lenta de contração e a grande dependência em relação ao metabolismo oxidativo. Acredita-se que atletas de *endurance* como maratonistas, nadadores de travessias e ciclistas tenham alta porcentagem de fibras do tipo I em relação a fibras do tipo II na sua composição muscular (MCARDLE, 2011).

Já as fibras do tipo IIB possuem coloração mais branca porque são menos capilarizadas e apresentam menor quantidade de mitocôndrias e mioglobina. Possuem alta concentração da enzima miosina ATPase, e por isso geram contrações rápidas e fortes. Dependem fortemente do sistema glicolítico a curto prazo e bem desenvolvido para a transferência de energia. Devido ao metabolismo predominantemente anaeróbico fadigam-se rapidamente, sendo apenas capazes de sustentar a contração até o músculo tornar-se dolorido e fadigado. São também denominadas fibras RG (rápidas glicolíticas) devido à sua capacidade de contração rápida e metabolismo glicolítico. Previamente acreditava-se que essas fibras possuíam miosina de cadeia pesada do tipo IIB (MHCIIb), porém estudos recentes que estenderam as análises das diferentes cadeias de miosina para o nível do DNA e seus transcritos evidenciaram que o que originalmente foi identificado como MHCIIb em humanos corresponde na verdade a uma isoforma de miosina de cadeia pesada do tipo x/d de roedores (MHCIIx/d) e que humanos não expressam a isoforma mais rápida de miosina, a MHCIIb. Apesar disso, as fibras do tipo IIB em humanos não foram rebatizadas de fibras tipo IIX, como em ratos. Por isso, dependendo do autor, as fibras do tipo IIB em humanos são associadas tanto a isoforma MHCIIb quanto a MHCIIx/d (SCHIAFFINO 2011, SILVA; CARVALHO, 2007).

Já as fibras do tipo IIA são consideradas intermediárias, pelo fato de sua velocidade de contração rápida estar combinada com uma capacidade moderada para a transferência de energia aeróbica (com uma alta concentração da enzima

aeróbica succinato desidrogenase ou SDS). São consideradas rápidas-oxidativas glicolíticas ou ROG (MCARDLE, 2011).

Em ratos, como já foi citado, estão presentes 4 principais isoformas de miosina de cadeia pesada, da mais lenta para a mais rápida: MHC I, MHC IIa, MHC IIx/d e MHC IIb. Essas 4 isoformas correspondem respectivamente às fibras do tipo I, IIA, IIX/D e IIB. Além disso, existem também em roedores fibras híbridas, ou seja, que expressam mais de um tipo de cadeia pesada de miosina (SCHIAFFINO 2011, SILVA; CARVALHO, 2007; STARON et al., 1998).

Uma característica muito importante do tecido muscular esquelético é sua capacidade adaptativa, ou seja, o potencial que esse tecido tem em modificar sua morfologia e metabolismo frente a determinados estímulos e demandas, como hormônios, estresse mecânico e fatores metabólicos. Isso inclui o aumento ou diminuição do volume celular (hipertrofia e atrofia, respectivamente), sua capacidade regenerativa após um trauma ou lesão e seu potencial em permutar fibras do tipo I em fibras do tipo II (e vice-versa).

1.2 O Controle da Massa Muscular e o Processo de Atrofia

A performance muscular é influenciada pelo *turnover* de proteínas contráteis. A produção de novas miofibrilas e a degradação de proteínas existentes consiste em um delicado balanço que, dependendo da condição, pode promover o crescimento ou a perda muscular. A síntese e a degradação de proteínas são reguladas de forma coordenada por vias de sinalização que são influenciadas por estresse mecânico, atividade física, disponibilidade de nutrientes e fatores de crescimento (SANDRI, 2008).

No músculo esquelético o ganho de massa se dá principalmente pela ação dos hormônios anabólicos como o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina- 1) e insulina. Em adição ao IGF-1 circulante, sintetizado principalmente pelo fígado sob controle do GH (hormônio do crescimento), há também uma produção local pelo próprio músculo esquelético de uma isoforma distinta. Tanto o IGF-1 quanto a insulina são responsáveis pela ativação da PI3K (fosfatidilinositol 3-Kinase), que por sua vez ativa Akt, uma proteína serina/treonina quinase chave no controle do metabolismo de proteínas musculares. No citoplasma, Akt fosforila S6 Kinase 1 (S6K1) via mTOR (*mammalian target of rapamycin*), o que aciona a

maquinaria de tradução (FANZANI et al., 2012; HOLZ et al., 2005; MA; BLENIS, 2009), aumentando a síntese de proteínas miofibrilares. Toda essa cascata de sinalização anabólica é conhecida como via PI3K/AKT/mTOR. Além disso, a via AKT/mTOR é também um ponto de convergência para outras vias de sinalização que promovem o crescimento muscular, como andrógenos (WHITE et al., 2013), agentes β 2-adrenérgicos (KLINE et al., 2007) e a proteína extracelular Wnt7a (*Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 7A*). A mTOR também é ativada por estímulo mecânico de uma maneira AKT independente através da nNOS (*neuronal nitric oxid synthase*) e da PA (*phosphatidic acid*) (SCHIAFFINO et al., 2013) . A Figura 2 mostra de forma resumida os diferentes estímulos que convergem para a síntese de proteínas no tecido muscular esquelético.

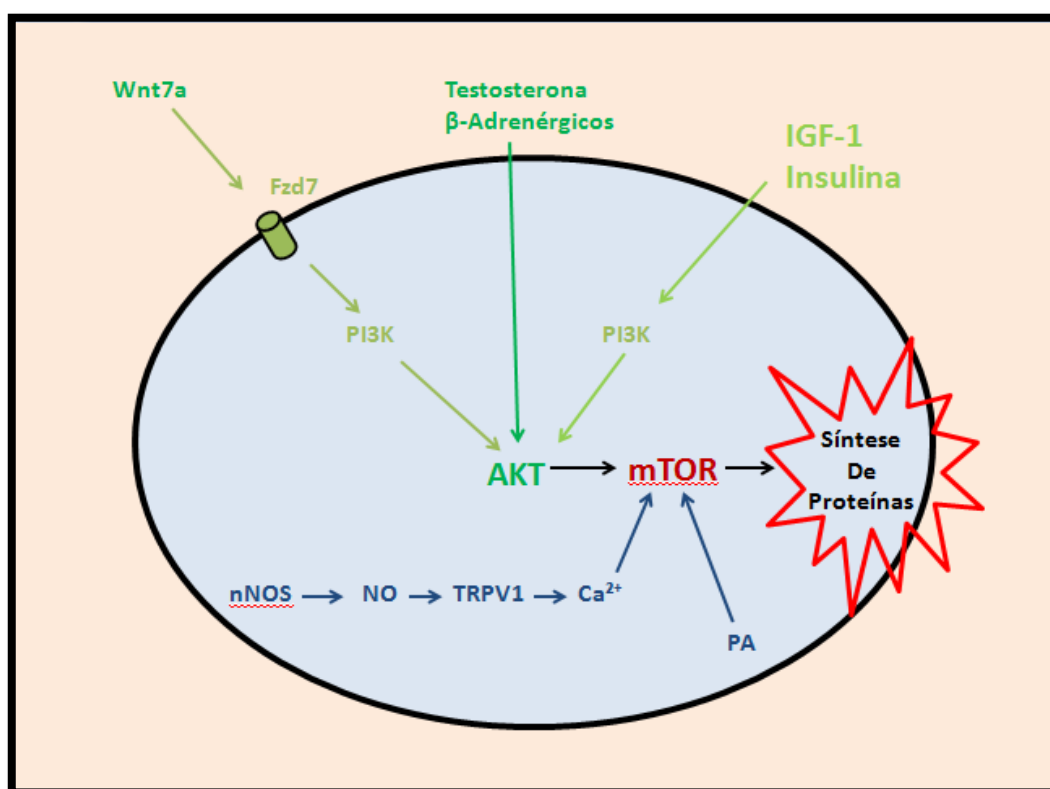


Figura 2. Sinalização do Crescimento Muscular. Modificado de Schiaffino et al.2013

A atrofia é definida como a perda do conteúdo proteico muscular e é caracterizada por uma redução na área de secção transversal das fibras, redução da força e aumento da fadigabilidade (ZHANG et al., 2007). Podemos citar como algumas causas de atrofia: desuso, imobilização e microgravidade (exemplos de

diminuição de estresse mecânico), AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) câncer e sepse (exemplos de fatores metabólicos), uso prolongado de glicocorticoides e hipertireoidismo (exemplos de sobrecarga hormonal).

De forma geral, a atrofia resulta de um desequilíbrio entre síntese e degradação de proteínas miofibrilares. Porém, são as vias proteolíticas as maiores responsáveis pela perda de massa muscular em várias situações atroficas (FAREED et al., 2006). O músculo esquelético contém três principais sistemas proteolíticos: o sistema lisossomal (via autofágica), o sistema proteolítico dependente de cálcio (baseado na atividade de proteases conhecidas como calpaínas) (GOLL et al., 1991) e o sistema ubiquitina proteassoma (UPS), que é considerado o principal responsável pela proteólise no músculo esquelético (BODINE et al., 2001). Este último sistema tem como principal função diminuir o conteúdo de todas as proteínas intracelulares durante o remodelamento do músculo (REID, 2005). As proteínas miofibrilares actina e miosina são dissociadas da estrutura sarcomérica após clivagem específica de proteínas de ancoramento presentes no disco Z (GOLL et al., 1991) e, uma vez no citosol, podem ser degradadas pelo proteassoma (LOWELL et al., 1986).

Toda proteína alvo de degradação pelo proteassoma precisa ser inicialmente ligada covalentemente a um peptídeo de 76 aminoácidos chamado ubiquitina (Ub). A ubiquitinação de uma proteína ocorre em várias etapas envolvendo 3 enzimas (Figura 3): E1 (enzimas ativadora da ubiquitina), E2 (enzimas carreadoras da ubiquitina ativada) e E3 (ubiquitina-ligases). As E3 são responsáveis pela especificidade da ubiquitinização, reconhecendo determinado substrato e transferindo o conjugado ubiquitina para resíduos de lisina na proteína alvo. A proteína marcada é então degradada no complexo 26S do proteassoma (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). Dentre os diferentes tipos de E3 ligases conhecidas as mais estudadas são MuRF-1 (muscle ringer finger protein 1) e MAFbx/Atrogin-1 (muscle atrophy F box). Essas proteínas são expressas exclusivamente no músculo esquelético e cardíaco e em conjunto são chamados de atrogenes. Os atrogenes são hiperexpressos em situações de proteólise, independentemente de sua causa.

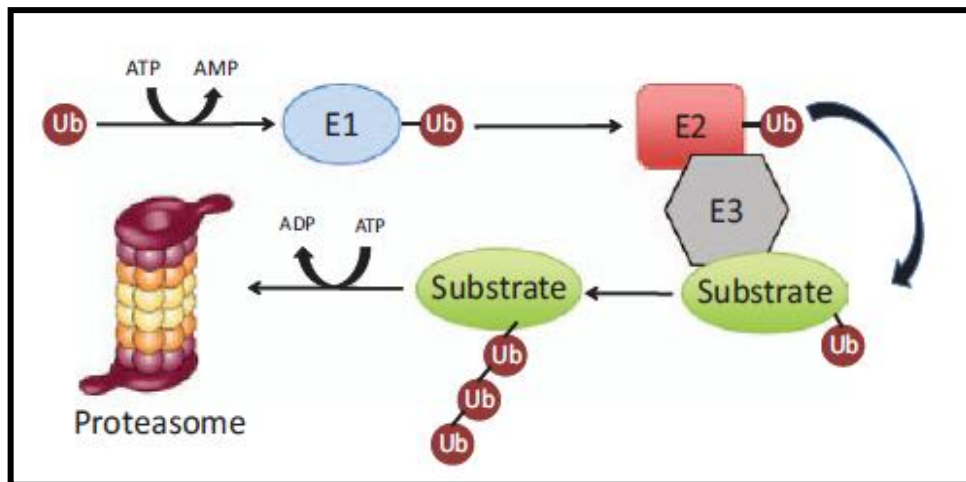


Figura 3. Diagrama ilustrando o Sistema Ubiquitina Proteassoma. A degradação de proteínas pelo proteassoma ocorre através de uma cascata enzimática de ubiquitinação. Pagan et al (PAGAN et al., 2013)

A manutenção da massa muscular esquelética é de fundamental importância para qualidade de vida, saúde e longevidade. A perda de massa muscular devido ao envelhecimento ou processos patológicos altera as habilidades físicas e implica em uma incapacidade para a condução das atividades diárias. Estudos recentes têm relacionado a perda de massa e força muscular com morbidade e mortalidade (MACHIDA; BOOTH, 2004; VANITALLIE, 2003).

Por isso, os mecanismos biológicos e possíveis estratégias terapêuticas que atuem no processo de atrofia são amplamente investigados. Nesse sentido a leucina, que é um aminoácido essencial (não sintetizado pelo organismo), tem sido muito estudada pelo seu papel protetor sobre a massa muscular. Muitos estudos em animais demonstraram que a leucina estimula a síntese de proteína muscular através da ativação de componentes da cascata de sinalização da via da PI3/Akt/mTOR (ANTHONY et al., 2000; BOLSTER et al., 2004; CROZIER et al., 2005). Assim, a leucina começou a ser investigada como um “fármaco-nutriente” com o potencial de promover aumento na síntese proteica muscular (KOOPMAN et al., 2006; RIEU et al., 2006)

No entanto, a partir de estudos de Sugawara e colaboradores, em um modelo animal de privação protéica, foi demonstrado um efeito protetor da ingestão de leucina, não através da ativação de vias de síntese, mas através da inibição de vias catabólicas, em especial a diminuição da atividade da via lisossomal. Nessa via a digestão dos conteúdos proteicos é realizada dentro do lisossomo, uma vesícula

contendo altas concentrações de enzimas digestivas, as hidrolases ácidas (proteases, glicosilases, lipases, nucleases e fosfatases) (SUGAWARA et al., 2009).

Porém, estudos em nosso laboratório demonstraram que a suplementação com leucina em uma modelo animal de atrofia por desuso (imobilização da pata posterior de ratos) foi capaz de atenuar a perda de massa muscular via inibição do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma, fato evidenciado pela diminuição da expressão dos atrogenes (MuRF-1 e MAFbx /Atrogin-1) (BAPTISTA et al., 2010).

Apesar desses achados, os mecanismos celulares pelos quais a leucina exerce seu papel protetor sobre musculatura esquelética, em especial em modelos de atrofia, ainda não são totalmente conhecidos. A via intracelular acionada por miostatina parece ser uma boa candidata como possível alvo da leucina, pois a miostatina é uma fator notoriamente atrofico, agindo como estimulador da principal via proteolítica muscular, o sistema ubiquitina-proteassoma (LOKIREDDY et al., 2011).

1.3 A Miostatina e o Controle da Massa Muscular

A miostatina, mais conhecida como GDF8 (Fator de Crescimento e Diferenciação 8) , faz parte da superfamília TGF β (*Transforming Growth Factor Beta*), uma larga família de proteínas regulatórias que controlam a proliferação e diferenciação celular em uma ampla variedade de tecidos, tanto no embrião quanto no adulto (HELDIN et al., 1997).

Durante o período embrionário a miostatina atua principalmente na fase proliferativa da miogênese, agindo como regulador negativo através da inibição da multiplicação de mioblastos, para que possam então seguir para a fase de diferenciação (JOULIA-EKAZA; CABELLO, 2006; RIOS, 2002; SCHUELKE et al., 2004). Essa ação anti-proliferativa está associada ao aumento da expressão da proteína p21 e o subsequente decréscimo da proteína CDK2 (quinase 2 dependente de ciclina) e também do decréscimo dos níveis de proteína retinoblastoma (RB) fosforiladas, o que mantém os mioblastos na fase G1 do ciclo celular (ARGILES et al., 2012; THOMAS et al., 2000).

Foi demonstrado que camundongos *knockout* para miostatina nascem com um acentuado e generalizado aumento de massa muscular, e esse aumento parece ser uma combinação de hiperplasia e hipertrofia muscular (MCPHERRON et al.,

1997). Indivíduos das raças Belgian Blue e Piemontês possuem mutação natural do gene da miostatina (sintetizam uma isoforma truncada da proteína), fato que os leva a nascer com o dobro da massa muscular comparados às raças não mutantes, devido à falta da regulação negativa durante a fase proliferativa da miogênese (MCPHERRON; LEE, 1997). Essa mutação também foi observada em outras espécies como cães e até no homem (MOSHER et al., 2007; SCHUELKE et al., 2004).

Embora a maioria dos estudos mostrem a miostatina como reguladora negativa da proliferação, alguns trabalhos também indicam uma ação sobre a fase de diferenciação dos mioblastos, através da inibição de fatores miogênicos como Pax7 (*Paired Box protein gene*), miogenina, MyoD (proteína de determinação de mioblasto) e Myf5 (fator miogênico 5) (RIOS, 2002; RODRIGUEZ et al., 2014).

Porém, além de seu papel crucial no desenvolvimento embrionário, a miostatina também é regulada no período pós-natal, estando envolvida em processos atróficos do tecido muscular (CARLSON et al., 1999; DELFINO et al., 2013; GONZALEZ-CADAVID et al., 1998; MCFARLANE et al., 2006; MENDIAS et al., 2013; WEHLING et al., 2000)

Essa ação se dá principalmente através do aumento da expressão dos atrogenes, em especial MAFbx/Atrogin-1, o que mostra sua relação com o sistema ubiquitina-proteassoma. A miostatina também aumenta os níveis da forma ativa do fator de transcrição FoxO1 (*Forkhead box class*), corroborando assim para o aumento de expressão dos atrogenes (MCFARLANE et al., 2006).

Além disso, a sinalização da miostatina também é capaz de inibir a fosforilação de AKT, inibindo assim a via de síntese proteica AKT/mTOR. Diversos estudos mostram uma inter-relação entre os níveis de miostatina e a atividade desta via (RODRIGUEZ et al., 2014). Lipina e colaboradores, por exemplo, demonstraram uma maior atividade dos componentes da via AKT/mTOR em músculos hipertróficos de animais *knockout* para miostatina quando comparados aos seus pares selvagens (LIPINA et al., 2010). Estudos *in vitro* evidenciaram que a superexpressão de miostatina atenuou a hipertrofia dos miotubos induzida pelo IGF-1, enquanto a inibição de miostatina levou a uma hipertrofia dependente de AKT (MORISSETTE et al., 2009).

A miostatina é produzida no músculo e, em menor extensão, no tecido adiposo, e é sintetizada como uma proteína precursora de aproximadamente 52

kDa, que contém um peptídeo sinal N-terminal, um pró-peptídeo e uma região C-terminal madura. O primeiro processo de clivagem remove o peptídeo sinal. O segundo processamento proteolítico, feito pela enzima Furina, dá origem a duas moléculas: um pró-peptídeo de aproximadamente 42 kDa, também chamado de LAP (*latency associated peptide*) e um fragmento C-terminal de aproximadamente 12 kDa, que é a miostatina madura. A dimerização desse fragmento maduro de 12 kDa (através de pontes dissulfeto), é que cria a forma ativa da proteína, que tem aproximadamente 28 kDa. (ARGILES et al., 2012; PEIRIS, ASHMAN, et al., 2014). Além disso, duas moléculas de pró-peptídeo (LAP) podem ligar-se de forma não covalente ao dímero de miostatina, dando origem ao *large latent complex*, de aproximadamente 75 kDa. Esse processo representa uma forma de auto-regulação dessa proteína, uma vez que o dímero ligado aos pró-peptídeos é inativo. A maior parte da miostatina circulante no sangue encontra-se nesse grande complexo latente. Para dissociar o dímero de miostatina desse complexo, são necessárias 4 metaloproteinases da família das BMP (*bone morphogenetic protein*).

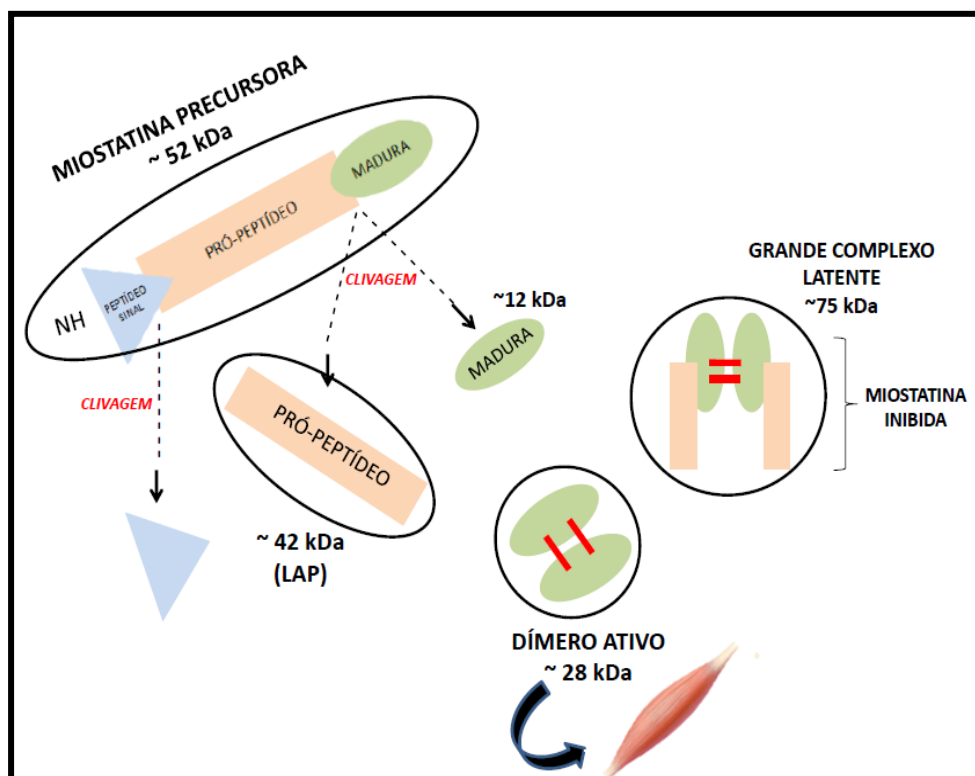


Figura 4. Biossíntese e processamento da miostatina. Adaptado de Peiris et al. (PEIRIS, ASHMAN, et al., 2014)

Uma vez ativada, a miostatina desencadeia uma cascata de sinalização muito similar a outros membros da superfamília TGF β (Figura 5). Ela apresenta uma grande afinidade pelo receptor de membrana activina RII B (ActRII B), o qual recruta, fosforila e ativa o receptor do tipo I (ALK4 e ALK5). Este por sua vez leva à fosforilação e ativação das proteínas Smads (*Sma and Mad (mothers against decapentaplegic) related protein*, família de proteínas intracelulares responsáveis pela transdução dos sinais extracelulares dos membros da TGF β para o núcleo da célula). Os Smads 2, 3 e 4 agregados vão para o núcleo onde funcionam como fator de transcrição para genes alvo (AOKI et al., 2009; HELDIN et al., 1997; JOULIA-EKAZA; CABELLO, 2006). A proteína Smad 7 é uma inibidora intracelular desta via, agindo no complexo Smad 2,3 4, além de funcionar como um feedback negativo inibindo a expressão do gene da miostatina (RODRIGUEZ et al., 2014)

A folistatina é uma glicoproteína monomérica conhecida por ligar-se de forma irreversível aos membros da superfamília TGF β , incluindo a miostatina, impedindo sua interação com seus respectivos receptores de membrana e antagonizando assim sua ação. Inicialmente foi descoberta em fluido folicular ovariano, mas hoje sabe-se que ela é expressa em uma variedade de tecidos e órgãos, exercendo um importante papel regulatório (AMTHOR et al., 2004). A folistatina é essencial para a formação e desenvolvimento muscular. Sua depleção causa múltiplas anormalidades nos músculos, pele e esqueleto, levando à morte perinatal (MATZUK et al., 1995). Camundongos transgênicos que superexpressam folistatina nascem com acentuado aumento de massa muscular, devido à ação inibitória da folistatina sobre a miostatina (LEE; MCPHERRON, 2001). Recentemente a folistatina tornou-se alvo de muitos estudos que buscam abordagens terapêuticas para doenças musculares (RODINO-KLAPAC et al., 2009)

A folistatina é altamente conservada entre as espécies e seu gene possui seis exons, o que dá origem às suas duas principais isoformas através de splicing alternativo no intron 5: a folistatina 288 e folistatina 315. Sabe-se que a folistatina 315 é secretada de forma mais rápida e é direcionada ao meio extracelular, ao passo que a 288 é secretada de forma mais lenta e permanece em boa parte no meio intracelular, pois essa isoforma é capaz de ligar-se aos proteoglicans associados à membrana (propriedade que a isoforma 315 não possui) (SAITO et al., 2005). Porém o significado biológico e funcional das duas isoformas ainda é pouco conhecido.

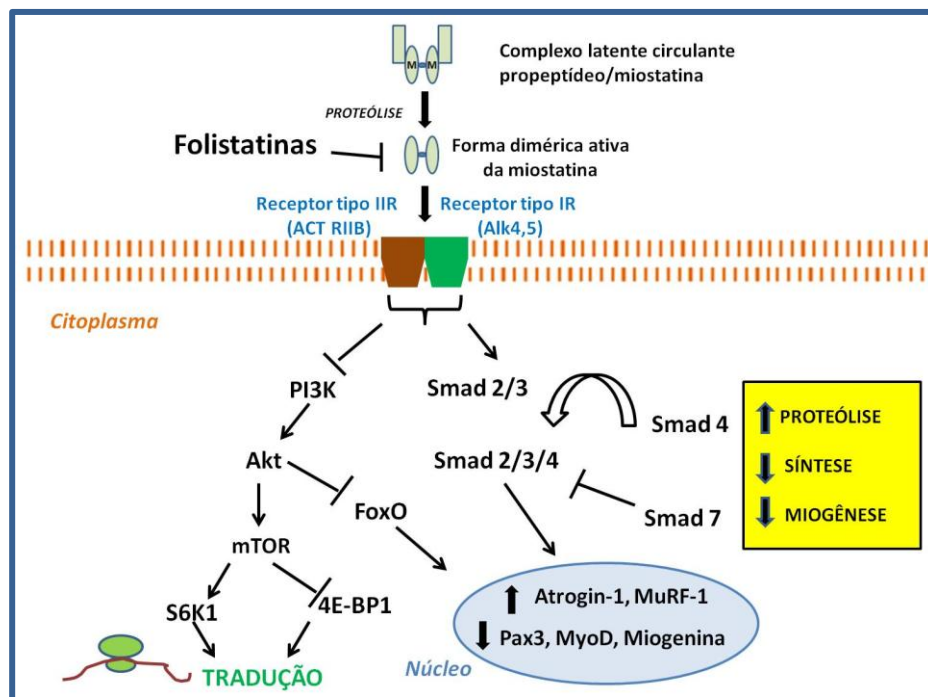


Figura 5. Sinalização da Via da Miostatina. Modificado de Argilés e colaboradores (ARGILES et al., 2012)

1.4 A Miostatina em Diferentes Situações de Atrofia

Diversos estudos clínicos e experimentais demonstraram que em diferentes situações fisiopatológicas onde há perda de massa muscular a expressão de miostatina está aumentada.

Alguns estudos mostram que a miostatina está envolvida na redução da musculatura esquelética frequentemente observada em doenças crônicas, como insuficiência cardíaca, insuficiência renal, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e câncer (ARGILES et al., 2012; MORISSETTE et al., 2009; THOMAS; MITCH, 2013). Pacientes HIV (vírus da imunodeficiência humana) positivo também demonstraram uma correlação positiva entre os níveis séricos de miostatina e a magnitude da perda muscular (GONZALEZ-CADAVID et al., 1998).

Esses quadros acima citados envolvem desordens catabólicas que levam à caquexia, uma síndrome metabólica associada a alguma doença de base e caracterizada por perda de massa muscular com ou sem perda de tecido adiposo.

Os mecanismos responsáveis pela caquexia ainda não estão completamente esclarecidos, mas diversos fatores parecem estar envolvidos, como redução na

atividade física e neuromuscular, ativação neuro-hormonal e aumento das concentrações séricas de citocinas inflamatórias. O aumento da expressão da miostatina parece também fazer parte deste cenário.

Outros estudos mostram o envolvimento da miostatina na sarcopenia, que é a perda muscular relacionada ao envelhecimento. Foi encontrado aumento da expressão proteica de miostatina em ratos senis, assim como aumento dos níveis séricos de miostatina em homens e mulheres idosos (BAUMANN et al., 2003; YARASHESKI et al., 2002).

Porém, alguns relatos indicam que a miostatina não é requerida em todas as condições que levam à atrofia muscular. Isso foi evidenciado também nos estudos de Aversa (AVERSA et al., 2012), cujos resultados sugerem que os níveis proteicos de miostatina não estão universalmente aumentados em pacientes com câncer. Nesse estudo o nível proteico de miostatina estava aumentado nos músculos de pacientes com carcinoma gástrico, mas não nos músculos de pacientes com câncer de pulmão.

A fase catabólica onde as análises são realizadas também pode acarretar resultados conflitantes e causar confusão na interpretação dos dados. Em estudos com a retirada de carga da pata traseira de ratos (suspensão) houve aumento transitório de RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) de miostatina em músculos brancos de ratos (1 dia), sem haver diferenças em relação aos controles após 3 ou 7 dias de suspensão do membro (CARLSON et al., 1999). Outro estudo envolvendo atrofia por denervação em ratos apontou supressão do RNAm de miostatina após 8 horas de cirurgia, níveis inalterados até o oitavo dia e leve aumento após 14 dias de denervação. Esses dados sugerem que a regulação da miostatina é complexa e variável, dependendo se a resposta de atrofia é rápida, como na denervação, ou lenta, como na sarcopenia decorrente do envelhecimento (BAUMANN et al., 2003). Essa complexidade indica a necessidade de novos estudos para melhor esclarecer o papel da miostatina nas diferentes situações de atrofia muscular.

6 CONCLUSÃO

A miostatina é uma proteína reguladora negativa da massa muscular. Há uma vasta literatura evidenciando aumento de sua expressão em diferentes situações e modelos de atrofia.

Nossa hipótese inicial contemplava que a expressão de miostatina se elevaria com a imobilização por gesso e que a leucina poderia provocar uma atenuação desse aumento. No entanto, os experimentos realizados nesse estudo evidenciaram uma forte regulação gênica no sentido de suprimir a via da miostatina neste modelo atrofico, sem no entanto haver alteração na expressão proteica. Apesar do resultado inesperado, algumas pesquisas evidenciaram respostas similares, mostrando que a miostatina não está universalmente hiperexpressa em todos os quadros que levam à atrofia muscular. Esses dados sugerem uma regulação complexa dessa proteína, com muitos fatores envolvidos em sua expressão, como as enzimas que fazem parte do seu processamento pós-traducional, fase catabólica analisada (aguda ou tardia), modelo de atrofia e tipo de músculo estudado (mais oxidativo ou mais glicolítico). Isso também sugere que em nosso modelo a resposta catabólica se dá por outras vias que não a da miostatina, e que a queda do seu RNAm pode representar uma resposta de contra-ponto à proteólise instaurada.

O aumento da expressão gênica de folistatinas (inibidoras endógenas da miostatina), acompanhado do aumento de expressão proteica aos 12 dias, apontam para uma resposta protetora da célula muscular frente ao estímulo atrofico. Esse aumento também foi descrito por alguns pesquisadores em outros modelos de atrofia.

Finalmente, a suplementação de leucina nos animais imobilizados foi capaz de potencializar a resposta das folistatinas, porém sem efeito na resposta da miostatina.

REFERÊNCIAS*

AMTHOR, H.; NICHOLAS, G.; MCKINNELL, I.; KEMP, C. F.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R.; PATEL, K. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. **Dev. Biol.**, v. 270, n. 1, p. 19-30, 2004.

ANTHONY, J. C.; ANTHONY, T. G.; KIMBALL, S. R.; VARY, T. C.; JEFFERSON, L. S. Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. **J. Nutr.**, v. 130, n. 2, p. 139-145, 2000.

AOKI, M. S.; SOARES, A. G.; MIYABARA, E. H.; BAPTISTA, I. L.; MORISCOT, A. S. Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. **Muscle Nerve**, v. 40, n. 6, p. 992-999, 2009.

ARGILES, J. M.; ORPI, M.; BUSQUETS, S.; LOPEZ-SORIANO, F. J. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass. **Drug Discov. Today**, v. 17, n. 13-14, p. 702-709, 2012.

AVERSA, Z.; BONETTO, A.; PENNA, F.; COSTELLI, P.; DI RIENZO, G.; LACITIGNOLA, A.; BACCINO, F. M.; ZIPARO, V.; MERCANTINI, P.; ROSSI FANELLI, F.; MUSCARITOLI, M. Changes in myostatin signaling in non-weight-losing cancer patients. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 19, n. 4, p. 1350-1356, 2012.

BAPTISTA, I. L.; LEAL, M. L.; ARTIOLI, G. G.; AOKI, M. S.; FIAMONCINI, J.; TURRI, A. O.; CURI, R.; MIYABARA, E. H.; MORISCOT, A. S. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. **Muscle Nerve**, v. 41, n. 6, p. 800-808, 2010.

BAUMANN, A. P.; IBEUNJO, C.; GRASSER, W. A.; PARALKAR, V. M. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. **J. Musculoskelet. Neuronal Interact.**, v. 3, n. 1, p. 8-16, 2003.

BODINE, S. C.; LATRES, E.; BAUMHUETER, S.; LAI, V. K.; NUNEZ, L.; CLARKE, B. A.; POUYMIROU, W. T.; PANARO, F. J.; NA, E.; DHARMARAJAN, K.; PAN, Z. Q.; VALENZUELA, D. M.; DECHIARA, T. M.; STITT, T. N.; YANCOPOULOS, G. D.; GLASS, D. J. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.

BOLSTER, D. R.; VARY, T. C.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. **J. Nutr.**, v. 134, n. 7, p. 1704-1710, 2004.

CARLSON, C. J.; BOOTH, F. W.; GORDON, S. E. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 2, pt 2, p. R601-606, 1999.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

COSTELLI, P.; MUSCARITOLI, M.; BONETTO, A.; PENNA, F.; REFFO, P.; BOSSOLA, M.; BONELLI, G.; DOGLIETTO, G. B.; BACCINO, F. M.; ROSSI FANELLI, F. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 38, n. 7, p. 531-538, 2008.

CROZIER, S. J.; KIMBALL, S. R.; EMMERT, S. W.; ANTHONY, J. C.; JEFFERSON, L. S. Oral leucine administration stimulates protein synthesis in rat skeletal muscle. **J. Nutr.**, v. 135, n. 3, p. 376-382, 2005.

D'ORLANDO, C.; MARZETTI, E.; FRANCOIS, S.; LORENZI, M.; CONTI, V.; DI STASIO, E.; ROSA, F.; BRUNELLI, S.; DOGLIETTO, G. B.; PACELLI, F.; BOSSOLA, M. Gastric cancer does not affect the expression of atrophy-related genes in human skeletal muscle. **Muscle Nerve**, v. 49, n. 4, p. 528-533, 2014.

DELFINO, G. B.; PEVIANI, S. M.; DURIGAN, J. L.; RUSSO, T. L.; BAPTISTA, I. L.; FERRETTI, M.; MORISCOT, A. S.; SALVINI, T. F. Quadriceps muscle atrophy after anterior cruciate ligament transection involves increased mRNA levels of atrogen-1, muscle ring finger 1, and myostatin. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.**, v. 92, n. 5, p. 411-419, 2013.

FANZANI, A.; CONRAADS, V. M.; PENNA, F.; MARTINET, W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. **J. Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 3, n. 3, p. 163-179, 2012.

FAREED, M. U.; EVENSON, A. R.; WEI, W.; MENCONI, M.; POYLIN, V.; PETKOVA, V.; PIGNOL, B.; HASSELGREN, P. O. Treatment of rats with calpain inhibitors prevents sepsis-induced muscle proteolysis independent of atrogen-1/MAFbx and MuRF1 expression. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 290, n. 6, p. R1589-1597, 2006.

GOLL, D. E.; DAYTON, W. R.; SINGH, I.; ROBSON, R. M. Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 13, p. 8501-8510, 1991.

GONZALEZ-CADAVID, N. F.; TAYLOR, W. E.; YARASHESKI, K.; SINHA-HIKIM, I.; MA, K.; EZZAT, S.; SHEN, R.; LALANI, R.; ASA, S.; MAMITA, M.; NAIR, G.; ARVER, S.; BHASIN, S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 95, n. 25, p. 14938-14943, 1998.

GREENHAFF, P. L.; KARAGOUNIS, L. G.; PEIRCE, N.; SIMPSON, E. J.; HAZELL, M.; LAYFIELD, R.; WACKERHAGE, H.; SMITH, K.; ATHERTON, P.; SELBY, A.; RENNIE, M. J. Disassociation between the effects of amino acids and insulin on signaling, ubiquitin ligases, and protein turnover in human muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 295, n. 3, p. E595-604, 2008.

HAM, D. J.; CALDOW, M. K.; LYNCH, G. S.; KOOPMAN, R. Leucine as a treatment for muscle wasting: A critical review. **Clin. Nutr.**, v. 33, n. 6, p. 937-945, 2014.

HAN, X. H.; JIN, Y. R.; TAN, L.; KOSCIUK, T.; LEE, J. S.; YOON, J. K. Regulation of the follistatin gene by RSPO-LGR4 signaling via activation of the WNT/beta-catenin pathway in skeletal myogenesis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 34, n. 4, p. 752-764, 2014.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, n. 6659, p. 465-471, 1997.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 425-479, 1998.

HOLZ, M. K.; BALLIF, B. A.; GYGI, S. P.; BLENIS, J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 569-580, 2005.

JOULIA-EKAZA, D.; CABELLO, G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. **Exp. Cell Res.**, v. 312, n. 13, p. 2401-2414, 2006.

JUNQUEIRA, L. C. C., J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, v.1. 2004

KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. **J. Nutr.**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 227S-231S, 2006.

KLINE, W. O.; PANARO, F. J.; YANG, H.; BODINE, S. C. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. **J. Appl. Physiol. (1985)**, v. 102, n. 2, p. 740-747, 2007.

KOOPMAN, R.; VERDIJK, L.; MANDERS, R. J.; GIJSEN, A. P.; GORSELINK, M.; PIJPERS, E.; WAGENMAKERS, A. J.; VAN LOON, L. J. Co-ingestion of protein and leucine stimulates muscle protein synthesis rates to the same extent in young and elderly lean men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 84, n. 3, p. 623-632, 2006.

LEE, S. J.; MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, n. 16, p. 9306-9311, 2001.

LIEBER, R. L. **Skeletal Muscle - Structure, Function and Plasticity**. Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins, 2002. 369 p.

LIPINA, C.; KENDALL, H.; MCPHERRON, A. C.; TAYLOR, P. M.; HUNDAL, H. S. Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signalling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice. **FEBS Lett.**, v. 584, n. 11, p. 2403-2408, 2010.

LOKIREDDY, S.; MCFARLANE, C.; GE, X.; ZHANG, H.; SZE, S. K.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. **Mol. Endocrinol.**, v. 25, n. 11, p. 1936-1949, 2011.

LOWELL, B. B.; RUDERMAN, N. B.; GOODMAN, M. N. Evidence that lysosomes are not involved in the degradation of myofibrillar proteins in rat skeletal muscle. **Biochem. J.**, v. 234, n. 1, p. 237-240, 1986.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 5, p. 307-318, 2009.

MACHIDA, S.; BOOTH, F. W. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 36, n. 1, p. 52-59, 2004.

MATZUK, M. M.; LU, N.; VOGEL, H.; SELLHEYER, K.; ROOP, D. R.; BRADLEY, A. Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. **Nature**, v. 374, n. 6520, p. 360-363, 1995.

MCARDLE, W. K., F; KATCH, V. **Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011. 1132 p.

MCFARLANE, C.; PLUMMER, E.; THOMAS, M.; HENNEBRY, A.; ASHBY, M.; LING, N.; SMITH, H.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. **J. Cell. Physiol.**, v. 209, n. 2, p. 501-514, 2006.

MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A. M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387, n. 6628, p. 83-90, 1997.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, n. 23, p. 12457-12461, 1997.

MENDIAS, C. L.; LYNCH, E. B.; DAVIS, M. E.; SIBILSKY ENSELMAN, E. R.; HARNING, J. A.; DEWOLF, P. D.; MAKKI, T. A.; BEDI, A. Changes in circulating biomarkers of muscle atrophy, inflammation, and cartilage turnover in patients undergoing anterior cruciate ligament reconstruction and rehabilitation. **Am. J. Sports Med.**, v. 41, n. 8, p. 1819-1826, 2013.

MOLINARO, E. M. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 2**. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, v.2. 2010. 1253 p.

MORISSETTE, M. R.; COOK, S. A.; BURANASOMBATI, C.; ROSENBERG, M. A.; ROSENZWEIG, A. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 297, n. 5, p. C1124-1132, 2009.

MOSHER, D. S.; QUIGNON, P.; BUSTAMANTE, C. D.; SUTTER, N. B.; MELLERSH, C. S.; PARKER, H. G.; OSTRANDER, E. A. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. **PLoS Genet.**, v. 3, n. 5, p. e79, 2007.

PAGAN, J.; SETO, T.; PAGANO, M.; CITTADINI, A. Role of the ubiquitin proteasome system in the heart. **Circ. Res.**, v. 112, n. 7, p. 1046-1058, 2013.

PEIRIS, H. N.; ASHMAN, K.; VASWANI, K.; KVASKOFF, D.; RICE, G. E.; MITCHELL, M. D. Method Development for the Detection of Human Myostatin by High-Resolution and Targeted Mass Spectrometry. **J. Proteome Res.**, 2014.

PEIRIS, H. N.; PONNAMPALAM, A. P.; MITCHELL, M. D.; GREEN, M. P. Brief Communication: Sexual dimorphic expression of myostatin and follistatin like-3 in a rat trans-generational under-nutrition model. **Nutr. Metab. (Lond.)**, v. 7, p. 44, 2010.

REID, M. B. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. **Am J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 288, n. 6, p. R1423-1431, 2005.

RIEU, I.; BALAGE, M.; SORNET, C.; GIRAUDET, C.; PUJOS, E.; GRIZARD, J.; MOSONI, L.; DARDEVET, D. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. **J. Physiol.**, v. 575, n. Pt 1, p. 305-315, 2006.

RIOS, R., CARNEIRO, I., ARCE, V.M, DEVESA, J. Myostatin is na inhibitor of myogenic differentiation. **AJP-Cell Physiol.** 2002.

RODINO-KLAPAC, L. R.; HAIDET, A. M.; KOTA, J.; HANDY, C.; KASPAR, B. K.; MENDELL, J. R. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. **Muscle Nerve**, v. 39, n. 3, p. 283-296, 2009.

RODRIGUEZ, J.; VERNUS, B.; CHELH, I.; CASSAR-MALEK, I.; GABILLARD, J. C.; HADJ SASSI, A.; SEILIEZ, I.; PICARD, B.; BONNIEU, A. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 71, n. 22, p. 4361-4371, 2014.

SAITO, S.; SIDIS, Y.; MUKHERJEE, A.; XIA, Y.; SCHNEYER, A. Differential biosynthesis and intracellular transport of follistatin isoforms and follistatin-like-3. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5052-5062, 2005.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology**, v. 23, n. 3, p. 160-170, 2008.

SCHIAFFINO, S.; DYAR, K. A.; CICILIOT, S.; BLAAUW, B.; SANDRI, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS J.**, v. 280, n. 17, p. 4294-4314, 2013.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber type in mammalian skeletal muscle. **Physiol. Rev.** **91**: p.1447–1531, 2011.

SCHUELKE, M.; WAGNER, K. R.; STOLZ, L. E.; HUBNER, C.; RIEBEL, T.; KOMEN, W.; BRAUN, T.; TOBIN, J. F.; LEE, S. J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 26, p. 2682-2688, 2004.

SILVA, M; CARVALHO, R. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **R. Bras. Zootec.**, v.36, *suplemento especial*, p.21-31, 2007

SMITH, I. J.; AVERSA, Z.; ALAMDARI, N.; PETKOVA, V.; HASSELGREN, P. O. Sepsis downregulates myostatin mRNA levels without altering myostatin protein levels in skeletal muscle. **J. Cell Biochem.**, v. 111, n. 4, p. 1059-1073, 2010.

STARON, R.; KRAEMER, W.; HIKIDA, R.; FRY, A.; MURRAY, CAMPOS, G. Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats. **Histochem. Cell Biol.**, 111:p.117–123, 1999.

SUGAWARA, T.; ITO, Y.; NISHIZAWA, N.; NAGASAWA, T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. **Amino Acids**, v. 37, n. 4, p. 609-616, 2009.

SUGINO, K.; KUROSAWA, N.; NAKAMURA, T.; TAKIO, K.; SHIMASAKI, S.; LING, N.; TITANI, K.; SUGINO, H. Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 21, p. 15579-15587, 1993.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 51, p. 40235-40243, 2000.

THOMAS, S. S.; MITCH, W. E. Mechanisms stimulating muscle wasting in chronic kidney disease: the roles of the ubiquitin-proteasome system and myostatin. **Clin. Exp. Nephrol.**, v. 17, n. 2, p. 174-182, 2013.

VANITALLIE, T. B. Frailty in the elderly: contributions of sarcopenia and visceral protein depletion. **Metabolism**, v. 52, n. 10 Suppl 2, p. 22-26, 2003.

WEHLING, M.; CAI, B.; TIDBALL, J. G. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. **FASEB J.**, v. 14, n. 1, p. 103-110, 2000.

WHITE, J. P.; GAO, S.; PUPPA, M. J.; SATO, S.; WELLE, S. L.; CARSON, J. A. Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 365, n. 2, p. 174-186, 2013.

YARASHESKI, K. E.; BHASIN, S.; SINHA-HIKIM, I.; PAK-LODUCA, J.; GONZALEZ-CADAVID, N. F. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. **J. Nutr. Health Aging**, v. 6, n. 5, p. 343-348, 2002.

ZHANG, P.; CHEN, X.; FAN, M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. **Med. Hypotheses**, v. 69, n. 2, p. 310-321, 2007.