



Facultade de Medicina
Departamento de Fisioloxía

**“Papel de la miostatina en la
regulación de la hematopoyesis”**

Susana Fernández Nocelo

2011

I

ISBN 978-84-9887-749-6 (Edición digital PDF)

D. Victor M. Arce Vázquez, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

HACE CONSTAR

Que Dña. Susana Fernández Nocelo ha realizado en este departamento y bajo su dirección la presente Tesis Doctoral titulada “Papel de la miostatina en la regulación de la hematopoyesis”, estimando que este trabajo se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado para optar al grado de Doctora.

Para que así conste, firmamos la presente:

Santiago, 8 de marzo de 2011

Fdo.: Victor M. Arce Vázquez

Fdo.: Susana Fernández Nocelo

A mi abuela Carmen
y a los Antonios

No hallarás otra tierra ni otro mar.
La ciudad irá en ti siempre. Volverás
a las mismas calles. Y en los mismos suburbios llegará tu vejez;
en la misma casa encanecerás.
Pues la ciudad siempre es la misma. Otra no busques -no la hay-
ni caminos ni barco para ti.
La vida que aquí perdiste
la has destruido en toda la tierra.

Konstantínos Kavafis, *La ciudad*

Ten siempre a Ítaca en la memoria.
Llegar allí es tu meta.
Mas no apresures el viaje.
Mejor que se extienda largos años;
y en tu vejez arribes a la isla
con cuanto hayas ganado en el camino,
sin esperar que Ítaca te enriquezca.
Ítaca te regaló un hermoso viaje
Sin ella el camino no hubieras emprendido.
Mas ninguna otra cosa puede darte.

Konstantínos Kavafis, *Ítaca*

Hoy voy a empezar
hoy es el comienzo del final...
Lady, Lady Blue
sin control, sin dirección
la luz se fue, ¿a dónde voy?

Bumbury, *Lady Blue*

A mi director de tesis, Victor Arce, por su apoyo profesional y personal a lo largo de todos estos años.

Al profesor Se-Jin Lee, (Johns Hopkins University School of Medicine) por cedernos los ratones MSTN^{-/-} y al Dr. Cadavid por el anticuerpo de MSTN.

Al profesor Jesús Devesa por dejarme empezar a trabajar en este departamento.

Al Dr. Jesús García Devesa y a la Dra. Pilar Fernández por su gran ayuda con las “sangres” de mis ratoncillos.

A la profesora Rosalía Gallego, por su ayuda con las inmunocitoquímicas.

A mis compañeros de laboratorio, a los que todavía están y a los que ya se fueron.

A José Antonio, por darme tanto la “paliza”, no hubiese sido lo mismo sin él.

Y a toda mi familia biológica y no biológica, y a todos los “desafortunados” que están siempre o han estado a mi lado fuese fácil o no.....

“Bilen, el boli y yo”

“Esa tamén vale”

“Jolín, no se porque...”

“Manda carallo”

“Me voy para Noyi”

Los “bichos” ourensanos

“Otra Estrella”

“Septentrión”

“Vete con cuidado”... “Mira que eres pesada...que pesada eres...eres la madre mas pesada”

“Y a donde vas? y con quien? y ...?”

“VALE?”

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La superfamilia del TGF- β	3
1.2. La miostatina	7
1.3. Biosíntesis de la miostatina y regulación de la miostatina latente	12
1.4. Mecanismo de acción de la miostatina	14
1.5. Contextualización del desarrollo muscular como respuesta a la miostatina	17
1.6. Hematopoyesis	19
1.6.1. Papel de los miembros de la superfamilia del TGF- β en la hematopoyesis	25
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Animales	35
3.1.1. Recuentos hematológicos	36
3.1.2. Ensayos de maduración de granulocitos	37
3.1.3. Ensayos de células de ratón formadoras de colonias	37
3.2. Líneas celulares	38
3.2.1. Proliferación	38
3.2.2. Apoptosis	39
3.2.3. Diferenciación	39
3.3. RT-PCR	40
3.4. <i>Western blot</i>	42
3.5. Inmunocitoquímica	43

4. RESULTADOS	45
4.1. La miostatina y su sistema de receptores se expresan en células hemáticas	47
4.1.1. Expresión de MSTN en células hemáticas	47
4.1.2. Expresión de MSTN en líneas celulares hematopoyéticas	48
4.2. Acciones de la miostatina en células hematopoyéticas	52
4.2.1. HL60	52
4.2.2. JURKAT	58
4.2.3. K562	59
4.3. Acciones de la miostatina sobre la hematopoyesis <i>in vivo</i>	61
4.3.1. Papel de la MSTN en la granulopoyesis	62
4.3.2. Papel de la MSTN en la eritropoyesis	66
5. DISCUSIÓN	69
6. CONCLUSIONES	79
7. BIBLIOGRAFÍA	83

Lista de Abreviaturas

Act: Activin
Act-R: Activin Receptor
ALK: Activin Recepto-like kinase
AML-1/Runx1: Acute Myeloid Leukemia 1/Runt-Related Transcription Factor 1
BAMBI: Bmp and Activin Membrane-Bound Inhibitor
Bcl-2: B-cell Lymphoma
BFU-E: Brust-Forming Units Erythroid
BMP: Bone Morphogenetic Protein
CDK: Cyclin-Dependent Kinase
CFU-E: Colony-Forming Units Erythroid
CFU-GEMM: Colony-Forming Units Granulocytes, Erythroblast, Machrophages and Megakaryocytes
CFU-GM: Colony-Forming Units Granulocyte/Monocyte
cDNA: Complementary Deoxyribonucleic Acid
c-mpl: c-Myeloproliferative Leukemia Virus
CSF: Colony Stimulating Factors
DMSO: Dimethyl Sulfoxide
EPO: Erythropoietin
ERK: Extracelullar Signal-Regulated Kinases
Fast: Forkhead Activin signal Transducer
FGF: Fibroblast Growth Factor
FLGR: Follistatin-Related Gene
FSH: Follicule Stimulating Hormone
FST: Follistatin
GASP-1: GDF Associated Serum Protein-1
G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GDF: Growth and Differentiation Factor
GH: Growth Hormone
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HSC: Haematopoietic Stem Cell
HPRT: Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transferase
IL: interleukin
LAP: Latency associated peptide
Lmo2: LIM domain only 2
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases
M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor
MIS: Müllerian Inhibiting Substance
MSTN: Myostatin
NK: Natural Killer

OAZ: Olfactory Neuron-Specific Transcription Factor-1/Early B-cell factor-like Associated Zinc Finger Protein

PCR: Polymerase Chain Reaction

PRL: Prolactine

RNA: Ribonucleic Acid

RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

SCL/tal-1: Stem Cell Leukaemia/T Cell Acute Leukaemia 1

Smad: Sma (small) + Mad (Mothers against dpp)

SMURF-1: Smads Ubiquitination Regulatory Factor-1

TLD: Tolloid

TGF- β : Transforming Growyh Factor- β

TPA: 12-O-Tetradecanolyphorbol-13-Acetate

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La superfamilia del TGF- β

La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (*Transforming Growth Factor- β* , TGF- β) comprende unos treinta factores de crecimiento y diferenciación que regulan un amplio rango de funciones celulares (proliferación, determinación, diferenciación, apoptosis, etc.) en todos los metazoos estudiados. Estas acciones son ejercidas tanto a lo largo del desarrollo embrionario como durante la vida adulta, participando, de esta forma, en el mantenimiento de la homeostasis y la regulación tisular¹. Debido a su complejo patrón de expresión espacio-temporal, así como a la naturaleza multifuncional de sus acciones, no es de extrañar que los diferentes miembros de la superfamilia fuesen descubiertos en el curso de líneas de investigación totalmente dispares. Así, el miembro fundador de la familia, el TGF- β 1, se identificó por su capacidad antimitogénica en células de origen epitelial² y hematopoyético³. Otro de los miembros de la familia, la activina, recibió su nombre de sus efectos estimuladores de la secreción de la hormona foliculoestimulante (*Follicle-Stimulating Hormone*, FSH) por la adenohipófisis⁴, mientras que las proteínas morfogenéticas del hueso (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs), fueron denominadas así por tratarse de potentes inductores de la formación de hueso y de cartílago⁵. Estos tres factores (TGF- β , activina y BMPs) definen los tres principales subgrupos de la familia, con una serie de características diferenciales, muchas de las cuales dependen de la utilización de vías de señalización específicas. La familia de las BMPs comprende, además, a la mayoría de los GDFs (*Growth and Differentiation Factors*) entre los que se incluyen el GDF-8 (miostatina, MSTN) y el GDF-11, su homólogo más cercano, que se incluyeron en este grupo a pesar de que no comparten la mayoría de las características del resto los GDFs.

Todos los miembros de la superfamilia del TGF- β comparten una serie de características comunes⁶, entre las que destaca el ser sintetizados en forma de precursores inactivos que deben ser procesados proteolíticamente para dar lugar a la forma activa. Este procesamiento se produce generalmente en un sitio dibásico consenso Arg-X-(Ser/Arg)-Arg, dando lugar a la liberación de un gran

segmento del precursor (generalmente denominado propéptido) y un fragmento C-terminal que contiene la región activa de la molécula. Posteriormente, el fragmento C-terminal dimeriza, dando lugar a la forma madura, biológicamente activa. A diferencia de lo que ocurre con el fragmento C-terminal, que se encuentra bastante conservado entre los distintos miembros de la superfamilia, los propéptidos guardan poca homología de unos miembros a otros. Sin embargo, existe un elevado grado de conservación de unas especies a otras para cada propéptido, indicativo de la importancia de sus funciones. En primer lugar, los propéptidos actúan como chaperonas, regulando el plegamiento y transporte intracelular durante los procesos de síntesis y maduración. Además, el propéptido es capaz de mantenerse unido al dímero maduro tras su secreción, impidiendo la unión del dímero con su receptor y dando lugar a un estado de “latencia” en el que la hormona es biológicamente inactiva. Esta capacidad del propéptido de unirse e inactivar al dímero maduro fue descrita inicialmente para el propéptido del TGF- β 1⁷ que, por ese motivo, recibió el nombre de LAP (*Latency Associated Peptide*). Posteriormente se comprobó que existen otras proteínas capaces de unirse a miembros de la superfamilia del TGF- β como la folistatina (FST), que se une con gran afinidad a Act-A⁸ y con menor afinidad a BMPs y GDFs⁹, o como noggin, chordin, dante, drm/kremlin, cerberus y caronte, capaces de unirse con distinta afinidad a BMPs y GDFs. Todas estas proteínas son capaces de impedir la unión del dímero maduro con su receptor, constituyendo uno de los niveles de regulación más importantes de los miembros de la superfamilia.

Todos los miembros de la familia de TGF- β transmiten su señal mediante un grupo de receptores con actividad serina-treonina quinasa que constituyen la familia de receptores del TGF- β . Estos receptores se clasifican en dos grupos diferentes, aunque evolutivamente relacionados, dependiendo de la existencia de una región rica en residuos de glicina-serina (región GS) en el dominio intracelular, inmediatamente por encima del dominio quinasa¹⁰⁻¹³ (figura 1). Los receptores con región GS son los denominados receptores tipo I y serán los que, tras ser activados por los receptores tipo II, se encargarán de transmitir la señal al interior de la célula.

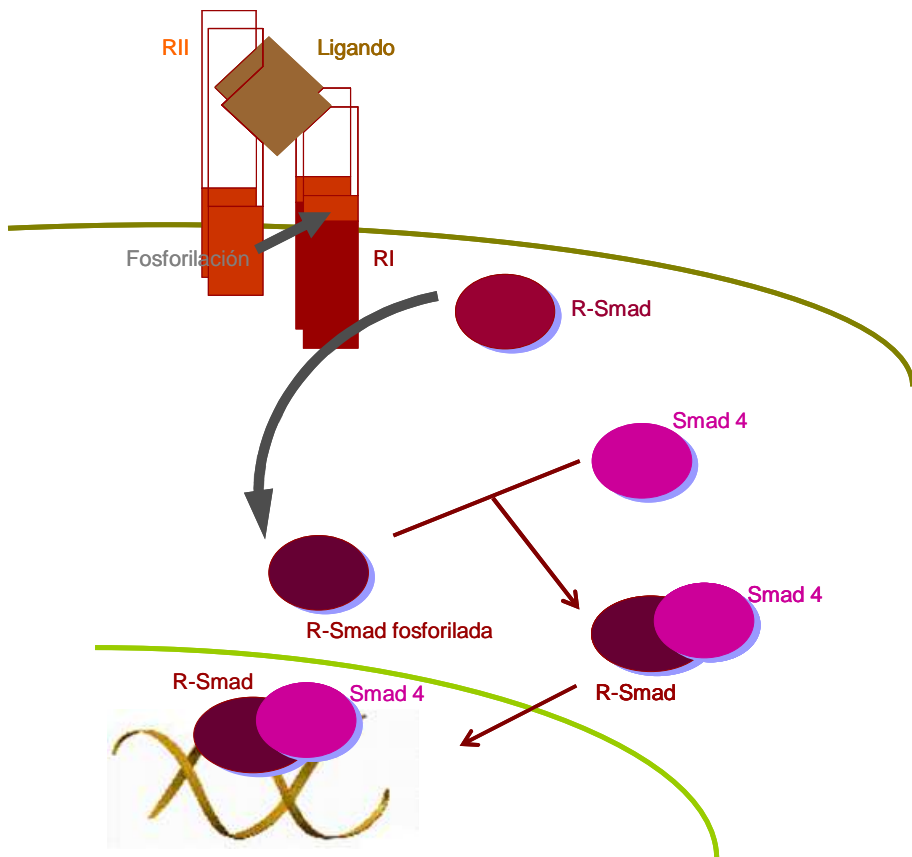


Figura 1.- Mecanismo de transducción de la señal en los receptores de la superfamilia del receptor TGF- β .

El proceso de señalización depende de la formación de complejos heterodiméricos de ligando, receptores tipo I y receptores tipo II, con una estequiometría 2:2:2 (figura 1). Existen dos modos de unión del ligando a los receptores: unión secuencial y unión cooperativa. En el modo de unión secuencial, característico del grupo del TGF- β y activinas, el ligando se une primero al receptor tipo II y posteriormente el receptor tipo I es incorporado al complejo^{14,15}. En el modo de unión cooperativa, propio de las BMPs, ninguno de los receptores tiene afinidad suficiente para unirse al ligando por separado, por lo que lo hacen conjuntamente^{16,17}. En ocasiones, la funcionalidad de estos complejos puede estar regulada por la presencia de receptores accesorios

como betaglucato¹⁸ o endoglina¹⁹ o de proteínas como BAMBI (*Bmp and Activin Membrane-Bound Inhibitor*), que tiene una homología parcial con algunos receptores de tipo I de modo que inhibe la formación del complejo ligando con el receptor²⁰.

Una vez activados, los receptores tipo I van a inducir la fosforilación de un grupo de proteínas intracelulares denominadas Smads. Existen 8 tipos de Smads diferentes (denominadas Smad1-Smad8). Cinco de estas Smads (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 y Smad8) pueden ser activadas por los receptores tipo I, por lo que reciben el nombre de R-Smads. Una vez fosforiladas, las R-Smads van a formar complejos triméricos con Smad4 que se traslocan al núcleo donde regularán la transcripción de genes diana^{21,22}.

Una de las principales características de esta familia de receptores es la gran disparidad que existe entre el número de receptores y el de ligandos. Hasta el momento se han identificado únicamente 7 receptores de tipo I y 5 receptores de tipo II y, lo más probable, es que la lista sea definitiva. Si tenemos en cuenta que las posibles combinaciones entre ellos son limitadas²³ y que existen más de 30 ligandos en la familia, resulta evidente que ligandos diferentes han de compartir el mismo par de receptores. Por otra parte, tampoco son posibles todas las asociaciones entre receptores y Smads, de forma que los receptores de la familia pueden dividirse en dos grandes grupos dependiendo de las Smad reclutadas. Un primer grupo estaría constituido por los receptores de TGF- β , activina, MSTN y nodal que activarían Smad2 y Smad3; mientras que un segundo grupo que engloba a las BMPs, algunos GDFs y el factor antimülleriano (*Müllerian Inhibiting Substance*, MIS) reclutaría Smad1, Smad5 y Smad8.

La actividad de las Smads puede ser regulada por otros factores, tanto de forma positiva como negativa. Uno de los principales reguladores positivos es SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*) que hace de puente entre el receptor y Smad2 y 3²⁴, mientras que dentro de los reguladores negativos destaca por su importancia SMURF-1 (*SMads Ubiquitination Regulatory Factor*-

1), que lleva a la ubiquitinación y degradación de Smad1 y 5²⁵. Existen, asimismo, dos Smads antagonistas, que poseen una escasa homología con el dominio de unión al DNA de las diferentes Smads: Smad6, que se une a Smad4 e impide la unión de ésta con Smad1²⁶ y Smad7, que se une a ciertos tipos de receptor tipo I y evita que éstos se asocien a Smad2 y 3²⁷.

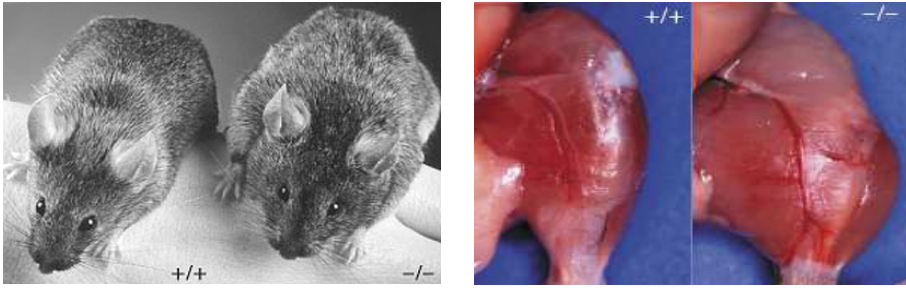
Finalmente, la unión de los Smads a los elementos de respuesta de los genes diana también está modulada por diferentes cofactores, ya que la unión del complejo R-Smad4 al DNA no es suficiente para mediar una activación transcripcional de la intensidad y especificidad requeridas. Los cofactores más importantes son Fast-1 y 2 (*Forkhead Activin Signal Transducer-1 y 2*), específico de la vía de TGF- β /activina²⁸, y OAZ (*Olfactory neuron-specific transcription factor-1/early B-cell factor-like Associated Zinc finger protein*) característico de la vía de las BMPs¹². El uso de cofactores, además de reforzar la especificidad para de las vías TGF- β /activina y BMPs, permite que la regulación sea específica para cada gen (según la presencia o ausencia del elemento respuesta apropiado para el complejo Smads/cofactor) y para cada tejido (presencia o ausencia del propio cofactor).

1.2. La miostatina

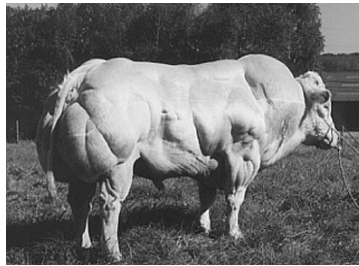
El año 1997 marcó la primera introducción formal del GDF-8, denominado MSTN por Se Jin Lee y Alexandra McPherron, investigadores de la John Hopkins University. Mientras buscaban posibles miembros de la superfamilia del TGF- β , el equipo descubrió un nuevo gen que guardaba un parecido asombroso con los miembros de la superfamilia previamente investigados²⁹. En dicho estudio, se pudo comprobar además, que la delección de la región del gen que codifica el dominio C-terminal de la proteína causaba un marcado incremento en la masa muscular esquelética en ratones. Este efecto era resultado de una combinación de hiperplasia e hipertrofia (figura 2A), sugiriendo que la función de la MSTN es regular negativamente el desarrollo del músculo esquelético²⁹. Posteriormente se pudo comprobar que mutaciones en

el gen de la MSTN eran las responsables de los fenotipos “doble musculados” descritos en diversas razas bovinas como la azul belga (figura 2B), la piamontesa o incluso la rubia gallega²⁹⁻³³; así como en ovejas³⁴ o perros³⁵ (figura 2C y 2D).

A



B



C



D



Figura 2.- La inactivación de la MSTN provoca marcado incremento de la masa muscular en diversas especies animales. **A.-** Ratón *knockout* de MSTN. **B.-** Buey de la raza Azul Belga, con delección de 11 nucleótidos en la secuencia codificante de la MSTN, que ocasiona la pérdida del dominio bioactivo de la misma por la aparición de un codón de parada prematuro. **C y D.-** Oveja y perro con mutaciones espontáneas en el gen de la MSTN.

En humanos se ha descrito un niño con fenotipo hipermusculado (figura 3A), que presenta una mutación puntual en el intrón 1 (G → A) que afecta el *splicing* de la proteína (figura 3B). El niño presenta la mutación en ambos alelos, mientras que su madre solo tenía mutado uno y no mostraba el fenotipo hipermusculado. Aunque en el estudio del árbol genealógico materno (no existen datos del padre), mostró la existencia de referencias acerca de un excepcional desarrollo muscular en generaciones anteriores.

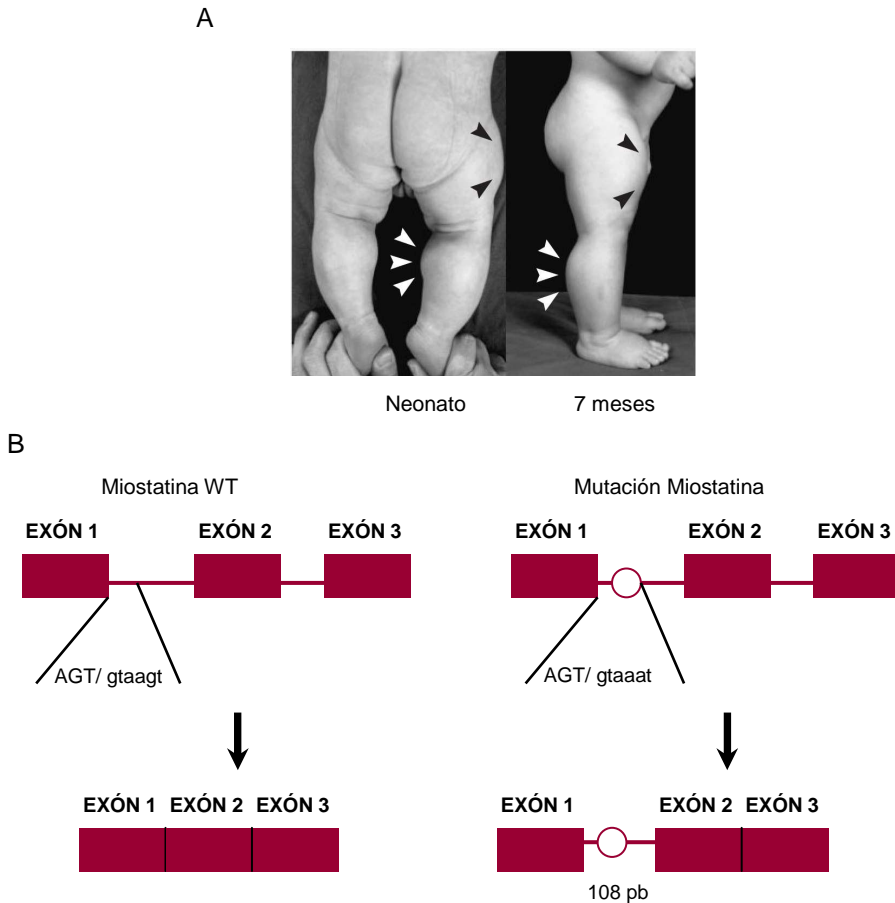


Figura 3.- Fenotipo hipermusculado en un niño con mutación homocigota del intrón 1 del gen de MSTN. **A.-** Desarrollo muscular en el nacimiento y a los 7 meses de edad. **B.-** Descripción de la mutación que provoca un cambio en el patrón de *splicing* de la MSTN.

El gen de la MSTN codifica una proteína de 376 aminoácidos que comparte las características propias de los miembros de la superfamilia, como es la presencia de un péptido señal que especifica su destino como proteína de secreción, y de un sitio dibásico consenso Arg-X-(Ser/Arg)-Arg que tras ser procesado proteolíticamente da lugar a un dímero maduro C-terminal de 109 aa. Cada una de las subunidades del dímero posee nueve residuos conservados de cisteína (siete en otros miembros), ocho de los cuales están implicados en la formación de enlaces disulfuro intracatenarios, mientras que el noveno participa en la formación del puente intermolecular que da lugar a la formación del homodímero activo.

La MSTN se encuentra extraordinariamente conservada en la práctica totalidad de especies investigadas, especialmente la secuencia de la región C-terminal que es idéntica entre humanos, ratones, ratas, cerdos, pollos y pavos. Esta conservación de la secuencia de la proteína, sugiere su gran importancia fisiológica. El ortólogo de MSTN en humanos³⁶ se localiza en el brazo largo del cromosoma 2 y se organiza en tres exones que codifican 125, 124 y 126 aa respectivamente (en humanos, MSTN tiene 375 aa) separados por dos intrones de 1,8 y 2,4 kb.

En ratón, la MSTN se expresa fundamentalmente en músculo esquelético tanto en animales adultos como durante el desarrollo²⁹. La presencia de MSTN puede ser detectada por primera vez en embriones de 9,5 días en los somitas con un mayor grado de madurez. En el día 10,5 el mRNA de MSTN es evidente ya en prácticamente todos los somitas y se localiza específicamente en el miotomo, permaneciendo restringida a este compartimento en las etapas posteriores del desarrollo. En animales adultos, la MSTN es detectada de forma predominante en músculo esquelético, con niveles variables entre los diferentes músculos estudiados. Aunque en niveles mucho más bajos, también se ha detectado su expresión en músculo cardíaco³⁷⁻⁴³, tejido adiposo^{29,33,44,45}, glándula mamaria⁴⁶, hueso⁴⁷, cerebro^{48,49}, útero⁵⁰⁻⁵² y testículos⁵⁰.

1.3. Biosíntesis de la miostatina y regulación de la miostatina latente

De manera similar a otros miembros de la superfamilia del TGF- β , la MSTN es sintetizada como un precursor que debe sufrir dos procesamientos proteolíticos para dar lugar a la molécula biológicamente activa²⁹. La primera escisión se produce en los 24 aa que conforman el péptido señal que especifica su destino como proteína de secreción (figura 4B). Posteriormente, se produce una segunda escisión en el sitio dibásico consenso Arg-Ser-Arg-Arg, situado en los aa 240-243, generando de este modo un fragmento N-terminal y otro C-terminal (figura 4C).



Figura 4.- Procesamiento de la MSTN. **A.-** Estructura de la MSTN mostrando los sitios de corte. **B.-** Escisión de los 24 aa que conforman el péptido señal. **C.-** Procesamiento proteolítico con el que se obtiene la especie biológicamente activa (fragmento C-terminal).

El fragmento C-terminal es la especie biológicamente activa y a excepción de cuando se especifique lo contrario, todas las referencias que se hagan de MSTN se referirán a él. Aunque la estructura tridimensional de este fragmento todavía no se conoce, el alto grado de similitud entre los miembros de la superfamilia del TGF- β y la MSTN sugiere que en su forma activa la MSTN esté formando un dímero unido por un enlace disulfuro⁵³⁻⁶¹. El fragmento N-terminal se conoce con el nombre de propéptido y, basándose en los datos obtenidos en otros miembros de la superfamilia, se cree que juega un importante papel en el correcto plegamiento del dominio C-terminal. Además, el propéptido también tiene un papel relevante en la regulación de la actividad del dímero C-terminal tras el procesamiento proteolítico.

La secreción de MSTN se produce en forma de un complejo no covalente de propéptido y dímero C-terminal (figura 4B) manteniéndose, de este modo, el dímero C-terminal inactivo⁶²⁻⁶⁴. En condiciones normales, prácticamente toda la MSTN circulante permanece unida al propéptido que la mantiene en un estado latente, inactivo⁶⁵. La importancia del propéptido a la hora de regular la actividad biológica de la MSTN es tal, que los ratones que sobreexpresan el propéptido^{62,66} presentan un fenotipo muscular similar al del ratón *knockout* de MSTN. Este estado latente de la MSTN es similar al descrito para el TGF- β ⁶⁷ y como en ese caso, el complejo latente puede ser activado artificialmente por calentamiento⁶⁴ o por acidificación⁶⁵. Los datos existentes en la actualidad sugieren que la activación del complejo latente *in vivo* está mediada por metaloproteasas de la familia BMP-1/TLD (*Bone Morphogenetic Protein-1/Tolloid*). De hecho, se ha visto que las cuatro proteinasas de la familia separan el propéptido por el aspartato 76 N-terminal, resultando de este modo la activación del dímero C-terminal⁶⁴. Además, con mutaciones que impiden el procesamiento por dichos enzimas, presentan un fenotipo similar al de los ratones *knockout* de MSTN⁶⁸.

Como ocurre también con otros miembros de la superfamilia, existen otras proteínas, que son capaces de unirse e inhibir la actividad del dímero C-terminal. Una de ellas es la FST que se une también con gran afinidad a otros

miembros de la superfamilia, como la Act-A⁸ o el GDF-11. Al igual que hace con estos factores, la FST impide la interacción de la MSTN con su receptor actuando, por tanto, como potente antagonista de ésta^{62,65}. Dado que durante el desarrollo embrionario la FST se expresa en células del miotomo, este mecanismo de modulación podría ser relevante a la hora de regular el desarrollo de la masa muscular^{69,70}. La importancia del papel de la FST en la regulación de la acción de la MSTN se ha demostrado en ratones transgénicos en los que la sobreexpresión de FST en músculo causa dramáticos incrementos en su desarrollo⁶², mientras que la ausencia de FST provoca la reducción de la masa muscular⁷¹. Otras dos proteínas implicadas en la regulación de la actividad del dímero C-terminal son (FSTL3) (FST-like-3), también denominada FLGR (*Follistatin-Related Gene*) y GASP-1 (*GDF Associated Serum Protein-1*), que forman complejos con la MSTN circulante^{72,73}. FLGR fue identificada como un gen relacionado con la FST y capaz de bloquear la actividad de muchos miembros de la familia del TGF- β y BMP-2 en ensayos *in vitro*^{74,75}. GASP-1 es un nuevo miembro de la familia de las proteínas con dominios FS que contiene, además, múltiples dominios asociados con la inhibición de proteasas lo que sugiere un mayor espectro de acciones. GASP-1 puede inhibir la actividad de MSTN y de BMP-11, pero no la de act-A ni la de TGF- β 1. GASP-1 se une directamente a la MSTN madura y al propéptido, dando lugar a la formación de un complejo terciario. Además, GASP-1 es altamente expresada en músculo esquelético sugiriendo que ésta puede unirse durante, o poco después de la secreción de la MSTN⁷³. Aunque el papel que juegan estas dos proteínas no está claro todavía, es posible que formen junto con el propéptido complejos terciarios, de forma que la MSTN circulante sería una mezcla heterogénea de estos complejos.

1.4. Mecanismo de acción de la miostatina

Como ocurre con el resto de miembros de la superfamilia del TGF- β la MSTN transmite su señal a través de complejos heterodiméricos de receptores tipo I y II, formando un complejo con una estequiometría 2:2:2¹⁰⁻¹³ (figura 1). La

unión de la MSTN al receptor tipo II recluta al receptor tipo I dando lugar a la fosforilación de este último en residuos de serina y treonina de su región GS. El cambio conformacional inducido por la fosforilación activa el dominio quinasa del receptor tipo I, con la subsiguiente fosforilación del principal mediador intracelular de la vía, las Smads. Posteriormente, la R-Smad activada por MSTN (Smad2/3) se asocia con Smad4, y el dímero se dirige al núcleo, donde regula transcripcionalmente a genes diana.

Mediante estudios de *cross-linking* se ha podido demostrar que la MSTN es capaz de unirse a los receptores de activina tipo II (ActRIIA y ActRIIB) con similar afinidad^{62,76,77}. La importancia de estos receptores en la señalización de MSTN *in vivo* está respaldada por estudios en ratones transgénicos en los cuales la expresión específica de dominante negativo de la forma ActRIIB en músculo esquelético induce un fenotipo esencialmente idéntico al ratón knockout de MSTN^{29,62}. Esta asociación con ActRIIB o ActRIIA implica, además que, al utilizar la MSTN Smad2, 3 para transducir su señal, el receptor tipo I utilizado tiene que ser necesariamente ALK4 (figura 5).

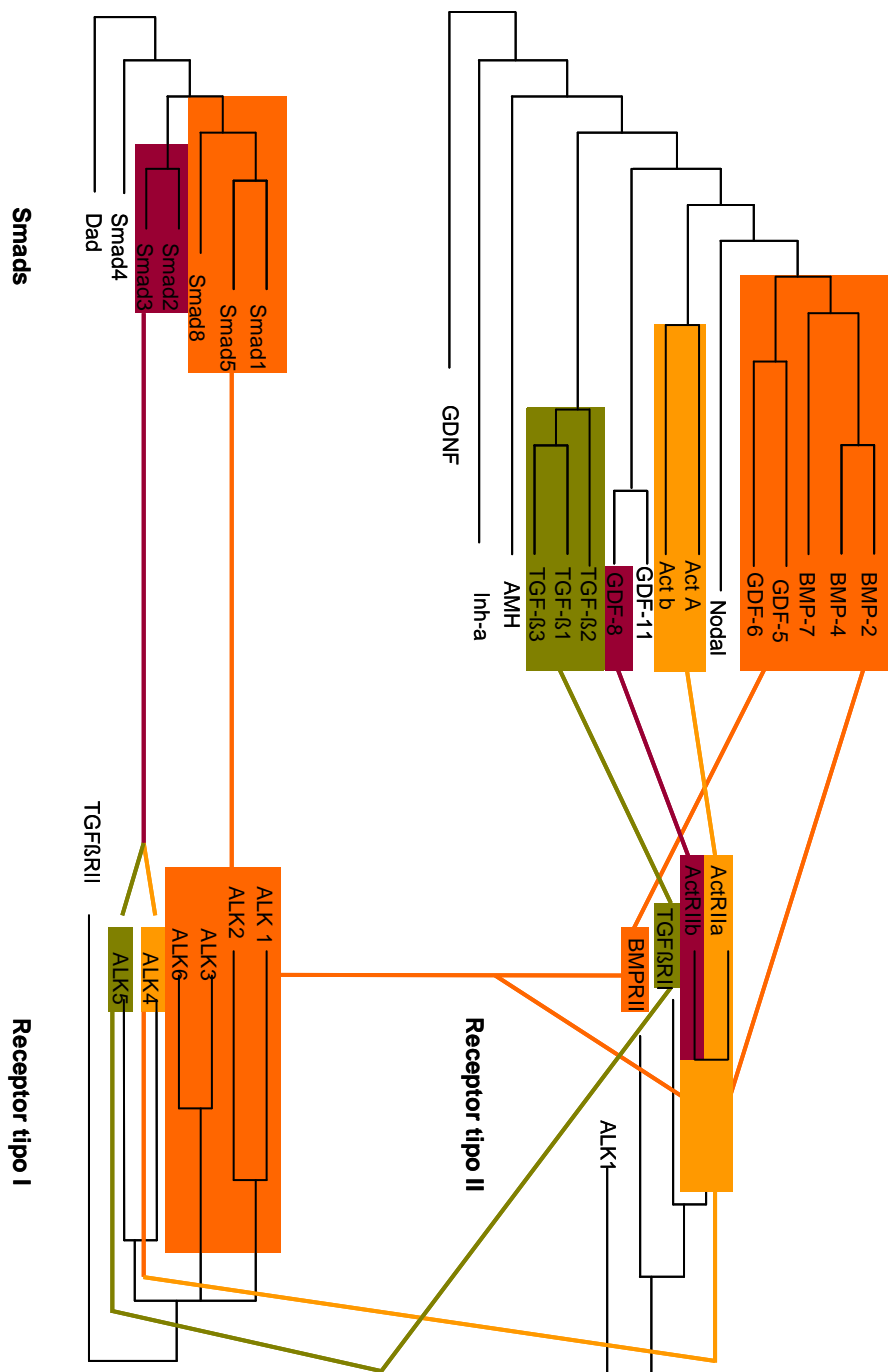


Figura 5.- Relaciones entre las distintas subfamilias de ligandos, receptores y R-Smads en la superfamilia del TGF-β.

1.5. Contextualización del desarrollo muscular como respuesta a la miostatina

El hecho de que los ratones con delección de la MSTN presentan hiperplasia e hipertrofia de las fibras musculares sugiere que la MSTN juega dos papeles distintos para la regulación del crecimiento de la masa muscular: regulación del número final de fibras musculares durante el desarrollo y regulación del crecimiento de la fibra muscular durante la etapa postnatal. A diferencia de lo que ocurre en los ratones *knockout* de MSTN, la sobreexpresión de una forma dominante negativa de MSTN (dnMS)⁷⁸, o el tratamiento con anticuerpos neutralizantes de MSTN^{79,80}, produce un incremento del tamaño de las fibras musculares (hipertrofia) pero no de su número. De forma similar, la sustitución de una tirosina por una cisteína en la región madura de la MSTN⁸¹ produce un aumento en el número de fibras totales (hiperplasia) con respecto a ratones *wild type* pero sin que se aprecie un aumento en su tamaño. Estos datos sugieren que cuando las funciones de la proteína endógena de MSTN son bloqueadas completamente²⁹ el incremento muscular es debido tanto a hiperplasia como a hipertrofia, mientras que si el bloqueo se produce de forma parcial, el incremento es debido a una de ellas solamente. En este sentido, es importante destacar que en ratones transgénicos que expresan inhibidores de MSTN (propéptido, FST y dominante negativo ActRIIB^{62,66,71,78}), que bloquean completamente la acción de la MSTN, se produce un efecto similar al encontrado en los ratones *knockout*.

El efecto de la MSTN sobre el número de fibras se debe a su capacidad de regular la proliferación y/o diferenciación de mioblastos durante el desarrollo. Numerosos estudios en la línea celular mioblástica C₂C₁₂ demuestran que la MSTN bloquea la proliferación de mioblastos a través de un incremento de los niveles de p21, y de una disminución de los niveles de Cdk2 y de la fosforilación de Rb⁸²⁻⁸⁴; mientras que el efecto de la MSTN sobre la diferenciación depende de la disminución de la expresión de los reguladores de la miogénesis MyoD, miogenina y Myf-5⁸⁴⁻⁸⁶ (figura 6).

En músculo adulto, la principal función de la MSTN es el mantenimiento de las células satélite en estado quiescente. Las células satélite son las encargadas de generar nuevas fibras musculares en circunstancias en las cuales la regeneración o crecimiento del músculo es requerido. Cuando la expresión de MSTN disminuye, las células satélite reentran en el ciclo celular, proliferando y fusionándose con fibras musculares ya existentes. Además, la ausencia de MSTN produce un incremento del número de células satélite⁸⁷. En este sentido, la MSTN actuaría como una chalona, es decir, como una molécula capaz de inhibir el desarrollo del órgano que la produce, de modo que a medida que el músculo crece, aumenta la expresión de MSTN hasta alcanzar unos niveles que detienen el crecimiento muscular.

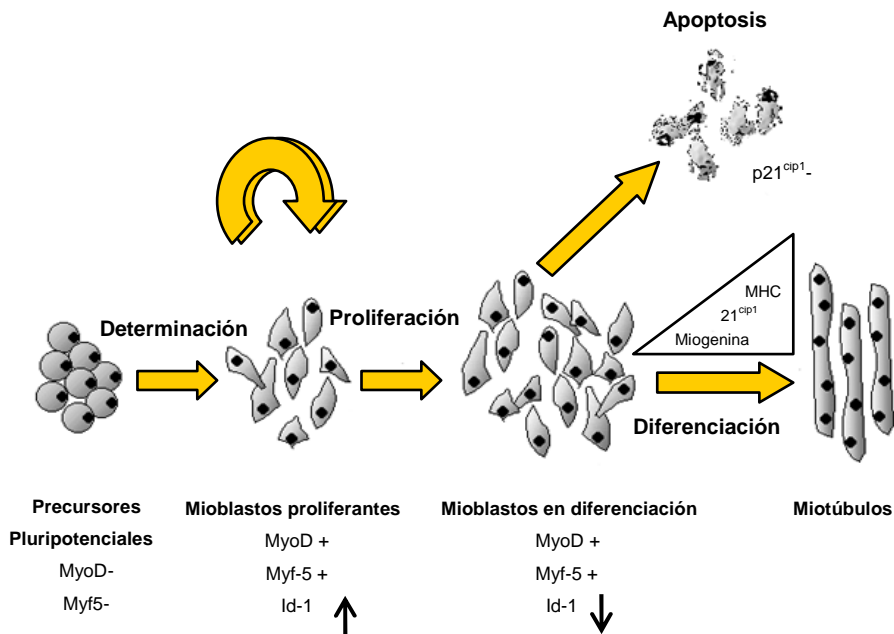


Figura 6.- Efecto de la MSTN sobre la regulación de la miogénesis *in vitro*.

La MSTN es también capaz de inhibir la síntesis de proteínas en miotubos⁸⁸ y adipocitos^{65,76,89}, de forma que la sobreexpresión de MSTN produce una marcada pérdida de masa muscular y de tejido adiposo en ratones adultos⁶⁵. De forma similar, en humanos se ha visto que existe un aumento de

los niveles de MSTN en músculo y suero de sujetos con pérdida muscular ocasionada por diferentes patologías como SIDA, cáncer u osteoartritis, así como en sujetos sometidos a periodos prolongados de inmovilización^{36,90,91}. Es importante señalar que el efecto de la MSTN sobre el tejido adiposo se debe a un efecto directo de la MSTN y no debe confundirse con el hecho de que los ratones carentes de MSTN presentan también una reducción de la grasa corporal que, en este caso, sería debido a un efecto indirecto, secundario al gran desarrollo de masa muscular que presentan estos animales^{33,92}.

Las importantes acciones que ejerce la MSTN sobre el desarrollo muscular han hecho que se esté investigado el bloqueo de sus efectos para promover el mantenimiento de la masa muscular o su crecimiento en situaciones de sarcopenia o en pacientes con enfermedades degenerativas musculares^{79,93}. En este sentido, estudios realizados en ratones muestran el papel que podría jugar la MSTN en, al menos, dos tipos de distrofia muscular (Duchenne y Becker). El bloqueo de la MSTN endógena mediante el uso de anticuerpos neutralizantes provoca tanto un aumento en el tamaño como en la fuerza muscular en estos ratones, así como una disminución en la degeneración muscular y la concentración de creatina quinasa en suero en ratones *mdx* (deficientes en distrofina)⁷⁹. De forma similar, el cruce de ratones *knockout* de MSTN con ratones *mdx*, produce una disminución de la fibrosis y de la infiltración de grasa en músculo sugiriendo una mejora en la regeneración muscular^{94,95}. Por el contrario, en ratones *dyw* (distrofia muscular por deficiencia de lamina), la ausencia de MSTN favorece la regeneración muscular pero sin reducir los cambios patológicos existentes. Además, la pérdida de tejido adiposo que se produce en estos animales produce un aumento de la mortalidad perinatal⁹⁶.

1.6. Hematopoyesis

Todas las células sanguíneas provienen de un precursor común denominado célula madre hematopoyética (*Haematopoietic Stem Cell*, HSC).

En el tercer mes de la gestación, las células madre hematopoyéticas migran del saco vitelino al hígado y a continuación al bazo, que son los principales órganos hematopoyéticos desde el tercero al séptimo mes de embarazo. A partir de este momento la médula ósea se convierte en el principal lugar de hematopoyesis, y en el momento del nacimiento, ya no existe hematopoyesis, o muy poca, en el hígado y el bazo. Como ocurre con el resto de células madre multipotenciales, dos rasgos principales caracterizan a estas HSCs. En primer lugar, son células con capacidad de dividirse de forma asimétrica, dando lugar a una célula que conserva su carácter multipotencial y a una célula comprometida. En segundo lugar, y en contraste con una célula unipotente que se diferencia sólo en un tipo celular, una HSC es multipotente y por consiguiente, capaz de generar los distintos tipos de células hemáticas maduras: eritrocitos, granulocitos, monocitos, megacariocitos y linfocitos. En fases iniciales de la hematopoyesis, la HSC se diferencia a una célula progenitora linfoide común o una célula progenitora mieloides común. Las células progenitoras linfoides dan lugar a células B y T; mientras que las células progenitoras mieloides generan de glóbulos rojos (eritrocitos), megacariocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) y monocitos (figura 7). El compromiso hacia una u otra vía depende de la expresión de distintos grupos de genes determinantes y específicos de linaje en los tiempos apropiados y en el orden correcto.

Aunque los factores implicados en el control de la diferenciación de las HSCs apenas se conocen, se han identificado diversos factores de transcripción necesarios para el mantenimiento y la proliferación de estas células. Mediante estudios de *gene targeting* realizados en ratones, se ha podido comprobar que los factores SCL/tal-1 (*Stem Cell Leukaemia/T Cell Acute Leukaemia 1*), AML-1/Runx1 (*Acute Myeloid Leukemia 1/ Runt-related transcription factor 1*), Lmo2 y GATA-1/2 son esenciales para la generación de HSCs, ya en el saco vitelino⁹⁷⁻⁹⁹. Además, SCL/tal-1 participa en la hematopoyesis en el adulto, siendo imprescindible para la eritropoyesis y la megacariopoyesis, pero no para la formación de granulocitos y monocitos¹⁰⁰, mientras que AML-1 desempeña un papel crucial en la megacariopoyesis y en el desarrollo de células T y B, aunque su efecto en el mantenimiento de las HSCs es menos claro¹⁰¹.

Uno de los aspectos claves en el control de la diferenciación de las HSCs es la presencia de determinadas señales en denominados nichos hematopoyéticos. Dentro de estas señales, destaca el importante papel desempeñado por múltiples citoquinas, cuya importancia en el control de la hematopoyesis se conoce ya desde las décadas de los 60 y 80 del pasado siglo, gracias a una serie de estudios en los que se logró identificar el primer factor capaz de estimular la formación de colonias específicas a partir de células progenitoras. Por este motivo, estos factores recibieron el nombre de factores estimuladores de colonias (*Colony-Stimulating Factors*, CSF). Posteriormente, se identificaron un gran número de factores capaces de regular la supervivencia, proliferación y diferenciación de células de estirpe hematopoyética. Algunos de estos factores son específicos para un determinado tipo celular, como ocurre con la eritropoyetina (EPO) que estimula la formación de eritrocitos, mientras que otros, como ocurre con la interleuquina-3 (IL-3) estimulan el desarrollo de prácticamente todos los linajes¹⁰² (tabla 1).

Aunque analizar con detalle el papel de las múltiples citoquinas implicadas en el control de la hematopoyesis está fuera de los objetivos de la presente revisión, de forma resumida podemos considerar que, en la actualidad, existen dos modelos que explican el papel de estos factores en la hematopoyesis: el modelo inductivo y el modelo estocástico. El modelo inductivo o instructivo establece que serían las distintas citoquinas, implicadas en la regulación de la hematopoyesis las responsables de dirigir el destino de los diferentes progenitores. Por el contrario, según el modelo estocástico o permisivo, el destino de cada célula hematopoyética estaría determinado intrínsecamente, actuando las citoquinas como meros potenciadores de la supervivencia y la proliferación celular. Ambos modelos están apoyados por numerosos datos experimentales, por lo que resulta imposible, a día de hoy, decir cuál de ellos resulta más apropiado.

En favor del modelo instructivo, están los resultados que muestran que la expresión ectópica de citoquinas restrictivas de linaje o de sus receptores en las líneas de células hematopoyéticas puede producir efectos similares a los de

la inducción de gen de un linaje específico. Así por ejemplo, en ratones en los que se sobreexpresa un receptor quimérico humano compuesto por el dominio extracelular del receptor de IL-3 y el citoplasmático de GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*) el tratamiento con IL-3 humano, produce una diferenciación granulocítica de los monocitos, lo que sugiere que la cadena citoplasmática GM-CSFRa emite una señal instructiva que conduce a un compromiso de linaje¹⁰³. En este sentido es importante señalar que la existencia de dominios esenciales para generar una señal de diferenciación pero prescindible para la mitogénesis, se ha demostrado para varios receptores de citoquinas^{104,105}. Sin embargo, las observaciones más llamativas que apoyan el modelo instructivo se obtuvieron al demostrar que la expresión ectópica de los receptores de citoquinas en células pluripotenciales puede conducir a alteraciones en el proceso de diferenciación^{106,107}. Kondo y col.¹⁰⁶ estudiaron las células progenitoras linfoides, un tipo de células que normalmente da lugar a linfocitos T y B y NK (*Natural Killer*), en las cuales se había inducido la expresión ectópica del receptor de IL-2b. Cuando estas células fueron cultivadas en presencia de IL-2, las células rápidamente generaron granulocitos y macrófagos, en lugar de únicamente células linfoides. De forma similar, se produjo una nueva reprogramación hacia la estirpe mieloide cuando estas células fueron transfectadas con GM-CSFR y tratadas con GM-CSF, pero no cuando el experimento se repitió con receptores de EPO o IL-7. Dado que, a diferencia de los progenitores linfoides que no lo expresan, las HSCs presentan niveles bajos pero detectables de GM-CSFR, se planteó la posibilidad de que la regulación negativa de la GM-CSFR fue uno de los eventos iniciales en el proceso de adhesión de los progenitores linfoides.

En apoyo al modelo estocástico, se ha visto que cuando precursores eritroides se transducen con retrovirus que codifican el receptor del factor estimulador de colonias de monocitos (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*, M-CSF), se produce un aumento del número de eritrocitos, pero no de monocitos al ser estimulados con M-CSF¹⁰⁸. De forma similar los receptores de prolactina (PRL), hormona de crecimiento (*Growth Hormone*, GH) o de la

trombopoyetina (c-mpl), son capaces de reemplazara al receptor de EPO a la hora de estimular la diferenciación eritroide *in vitro*^{109,110}.

Otro fuerte apoyo para el modelo estocástico proviene de la expresión ectópica del factor antiapoptótico, bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) en determinadas líneas celulares hematopoyéticas estimula la diferenciación hematopoyética en ausencia de citoquinas¹¹¹, mientras que la expresión forzada de bcl-2 es capaz de rescatar el déficit de células T que existen en ratones *knockout* de IL-7 o el déficit de monocitos en ratones deficientes M-CSF¹¹²⁻¹¹⁴.

Factor crecimiento hematopoyético	Sitios de producción	Principales funciones
Eritropoyetina	Riñón, hígado	Producción de eritrocitos
G-CSF	Células endoteliales, fibroblastos, macrófagos	Producción de neutrófilos
Trombopoyetina	Hígado, riñón	Producción de plaquetas
M-CSF	Fibroblastos, células endoteliales, macrófagos	Producción de macrófagos y osteoclastos
Ligando SCF/c-kit	Células estromáticas de la médula ósea	Células madre, supervivencia/división de células progenitoras
Ligando Flt-3	Fibroblastos, células endoteliales	Expansión de célula progenitora temprana; precélulas B
GM-CSF	Células T (TH1 y TH2), macrófagos, células cebadas	Producción de macrófagos, granulocitos; maduración y activación de células dendríticas
IL-3	Células T (TH1 y TH2), macrófagos	Crecimiento de células madre y células progenitoras mieloides; células cebadas
IL-5	Células T colaboradoras activas, sólo respuesta TH2	Producción de eosinófilos, crecimiento de células B murina
IL-6	Células T activadas, monolitos, fibroblastos células endoteliales	Estimulación de célula progenitora; producción de plaquetas; producción de inmunoglobulina en células B
L-11	Células estromáticas de la médula ósea y fibroblastos estimulados por IL-1	Factor de crecimiento para megacariocitos
IL-7	Células del estroma de médula ósea, fibroblastos	Supervivencia de células T

Tabla 1.- Citoquinas hematopoyéticas

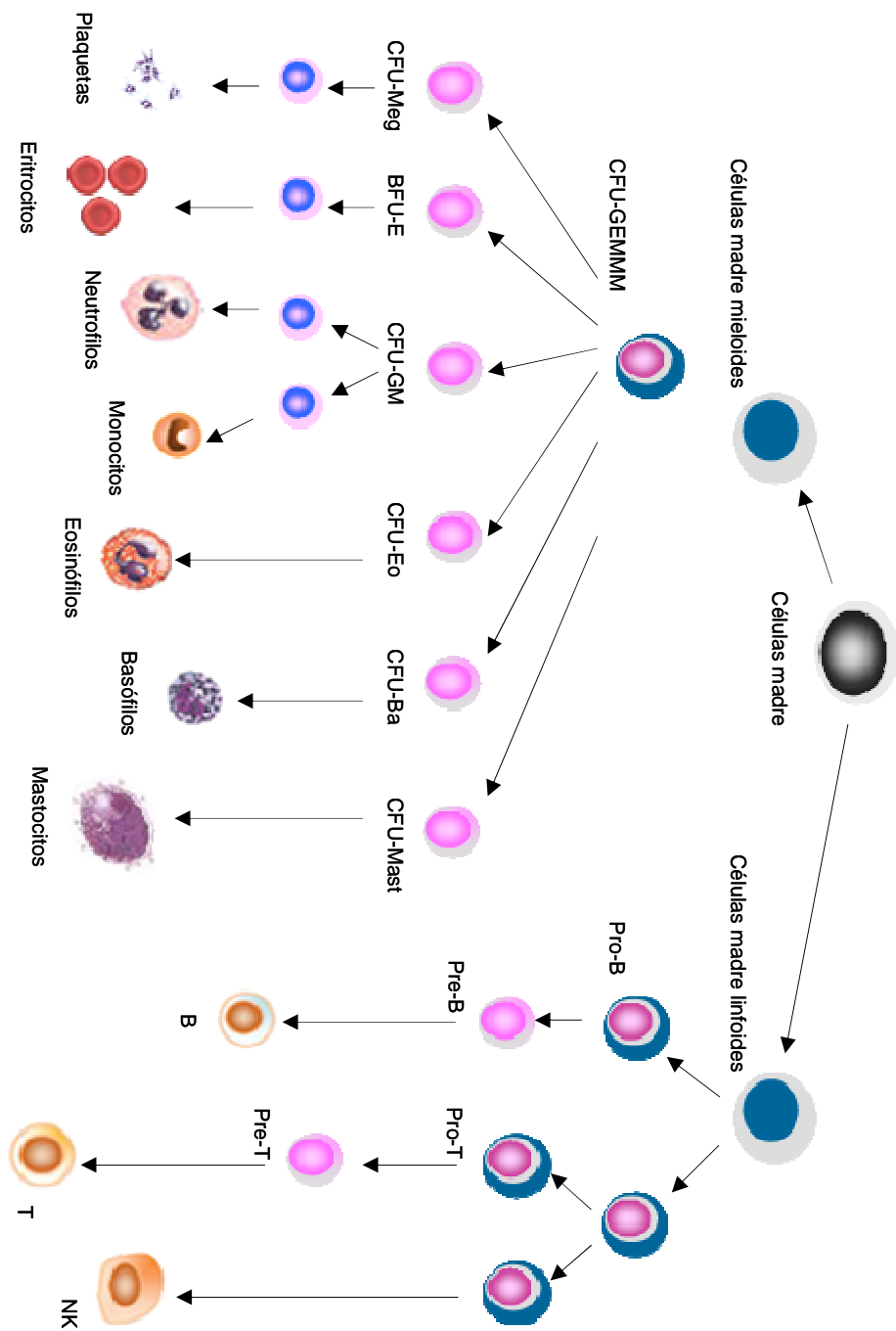


Figura 7.- Esquema general de la hematopoyesis

1.6.1. Papel de los miembros de la superfamilia del TGF- β en la hematopoyesis

Los miembros de la superfamilia del TGF- β desempeñan un papel crítico en la regulación de proliferación y diferenciación durante la hematopoyesis¹¹⁵⁻¹¹⁷. Existen numerosos estudios que demuestran que el TGF- β inhibe *in vitro* la proliferación de HSCs y de células progenitoras primitivas, tanto en humanos como en ratones¹¹⁸⁻¹²². Este efecto se ejerce a través de una parada de ciclo^{123,124} y se manifiesta incluso en presencia de determinadas citoquinas estimuladoras de la hematopoyesis como IL-3 o CFU-GM (*Colony-Forming Units Granulocyte/Monocyte*). De forma similar, el bloqueo transitorio de la señalización autocrina del TGF- β 1 por expresión de un dominante negativo mejora la cinética y la supervivencia de las HSCs humanas *in vitro*¹²⁵. Resultados similares han sido obtenidos *in vivo*, en los que se ha visto que la inyección de TGF- β 1 en la arteria femoral de ratones inhibe eficazmente la proliferación de progenitores hematopoyéticos multipotenciales en la médula ósea¹²⁶. En conjunto, estos hallazgos sugieren que TGF- β 1 es importante en el control de la quiescencia de HSCs y que tanto la producción autocrina de TGF- β 1 por HSCs, como la producida por células estromales en el nicho pueden contribuir al mantenimiento de dichas células^{127,128}. Por el contrario, los progenitores más diferenciados son más resistentes a la inhibición de TGF- β 1^{129,130}, aunque, en muchos casos, este efecto depende de la presencia de otros factores de crecimiento.

A diferencia del TGF- β 1, se ha visto que el TGF- β 2 actúa como un regulador positivo de las HSC, mientras que el TGF- β 3 solamente funciona como un inhibidor en las células hematopoyéticas primitivas^{122,131}. Sorprendentemente, este efecto estimulador del TGF- β 2 se manifiesta únicamente a bajas concentraciones, mientras que a concentraciones elevadas inhibe la proliferación¹³¹.

Existen también numerosos estudios que demuestran la importancia de los BMPs en la hematopoyesis, fundamentalmente durante el periodo

embrionario^{132,133}. La necesidad de la presencia de señales procedentes de BMPs en la puesta en marcha de la hematopoyesis está altamente conservada a lo largo de la evolución, desde el pez cebra y el *xenopus* al ratón y humano¹³²⁻¹⁴⁰. Las BMPs actúan principalmente estimulando la síntesis de células de estirpe eritroide, aunque existen datos contradictorios. Mientras que algunos autores¹⁴¹ han sido incapaces de encontrar ningún efecto significativo en la maduración eritrocítica, en otros estudios¹⁴² se observó una ligera inducción de colonias BFU-E (*Burst-Forming Units Erythroid*) por BMP4. Por otra parte, se ha visto también que la expresión ectópica de BMP4 es capaz de inducir la formación de un gran número de células eritroides a partir de tejido no mesodérmico, en cooperación con el factor de crecimiento de fibroblastos (*Fibroblast Growth Factor*, FGF) y act-A¹³⁶. También se ha visto que BMP4 induce la diferenciación hematopoyética en HSCs murinas y humanas *in vitro*^{139,143}.

Por último, dentro de las activinas, la act-A es la que parece ejercer un papel más importante en el control de la hematopoyesis. Durante el desarrollo embrionario, la act-A es fundamental para la diferenciación de los precursores mesodérmicos a hemangioblastos¹⁴³⁻¹⁴⁵. En adultos la act-A es constitutivamente expresada por las células del estroma en los microambientes hematopoyéticos, principalmente en las células endoteliales y mesenquimales¹⁴⁶, mientras su expresión es baja o indetectable tanto en HSCs como durante la diferenciación hematopoyética^{147,148}. Sin embargo, act-A posee un claro efecto inhibitor en la proliferación de HSCs murinas *in vitro*¹⁴⁸. Además, la act-A aumenta la formación de unidades formadoras de colonias multipotenciales (*Colony-Forming Units Granulocytes, Erythroblast, Macrophages and Megakaryocytes*, CFU-GEMM) y eritroides, tanto CFU-E (*Colony-Forming Units Erythroid*) como BFU-E¹⁴⁹, pero no produce ningún efecto en CFU-GM^{149,150} o incluso inhibe su formación^{151,152}.

La act-A ejerce también importantes efectos sobre las células mieloides adultas y, de hecho, algunas de estas células producen y secretan act-A¹⁵³, aunque en menor medida que las células estromales de la médula ósea. El

tratamiento con act-A inhibe la diferenciación de células M1 a macrófagos, disminuye el crecimiento y la apoptosis en células KU812¹⁵⁴, e inhibe el crecimiento, favorece la supervivencia y estimula la diferenciación de células HL-60^{155,156}. En células monocíticas activadas, la act-A inhibe la secreción de IL-1 β y aumenta la de su receptor¹⁵⁷ y ejerce un efecto positivo en la quimiotaxis, mientras que no afecta a la fagocitosis¹⁵⁸.

Existen algunos datos que sugieren que la activina puede inducir diferenciación megacariocítica¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Sin embargo, el papel más documentado es su implicación en la regulación de la eritropoyesis. Las primeras observaciones en este sentido, proceden de ratones, a los que se les administró act-A y se demostró un incremento del número de eritrocitos y reticulocitos circulantes^{162,163}. Como otros muchos factores de crecimiento hematopoyético, la act-A ejerce al menos dos efectos diferentes: estimulación de la proliferación de progenitores e inducción de diferenciación en las células maduras. Además la act-A es también capaz de inducir diferenciación e inhibirla en diversas líneas celulares de estirpe eritroleucémica, tanto murinas como humanas (K562)^{164,165}.

En lo referente al papel de la activina en linfopoyesis, éste se centra en las células B. La act-A regula negativamente la linfopoyesis de células B, al inducir parada del ciclo celular y al estimular la apoptosis^{146,166-169}. Además los precursores de células B cultivados en presencia de act-A son interrumpidos en un estado de diferenciación más temprano que las células cultivadas en ausencia de esta citoquina¹⁷⁰. En el caso de las células T, aunque se ha comprobado que act-A ejerce un efecto antiproliferativo en timocitos maduros *in vitro*, parece ser que este efecto sería ejercido de forma indirecta a través de su capacidad de modular la producción de IL-6¹⁷¹.

2. OBJETIVOS

Aunque la MSTN fue descrita inicialmente como una hormona implicada en la regulación del desarrollo muscular, existen cada día más estudios que demuestran que su importancia va mucho más allá de este papel tan específico, interviniendo en la regulación de la proliferación y la diferenciación de muchos otros tipos celulares.

El objetivo del presente estudio ha sido analizar el papel de la MSTN en la regulación de la hematopoyesis, tanto *in vivo* como *in vitro*, estudiando sus efectos sobre la proliferación, diferenciación y supervivencia de distintos tipos de células hematopoyéticas, así como las vías de señalización implicadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Se utilizaron ratones $MSTN^{+/+}$ y $MSTN^{-/-}$ (C57BL/6J- $MSTN^{lean}$), cedidos por el Prof. Se-Jin Lee, (Johns Hopkins University School of Medicine). Estos ratones se caracterizan por presentar una delección de la región C-terminal de la proteína²⁹ que resulta en una molécula inactiva. Los animales se estabularon con temperatura y humedad constantes y sometidos a periodos artificiales de luz y oscuridad. La alimentación se realizó con dieta estándar (SAFE, Augy, Francia) suministrada *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo la normativa vigente (Real Decreto 1201-2005 y Decreto 296/2008) en relación con la utilización de animales de experimentación. Las colonias se mantuvieron en heterocigosis, determinándose el genotipo de cada animal a partir de muestras de DNA extraídas de una biopsia de tejido de la cola.

Para la realización del genotipado, las muestras de tejido se incubaron en agitación a 55°C durante toda la noche en 100 µl de buffer compuesto por NaCl (100 mM), Tris-HCl (10 mM) pH 7,5, EDTA (1 mM) y 1% SDS y 5 µl (20 mg/mL) de proteinasa K. Posteriormente, la muestra se centrifuga para eliminar los restos de tejido, se añade un volumen de etanol a 4°C y se homogeniza. Para realizar la PCR se utilizaron 1 µg de DNA y 1,25 U de Taq polimerasa (Thermo, Ulm, Alemania) en 50 µl de una solución compuesta por Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,2 mM de cada dNTP y 0,4 µM de cada uno de los cebadores. Las condiciones de la reacción de PCR así como la secuencia de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 2. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio en el sistema digital de análisis de imagen GelDoc 1000 (BioRad, Berkeley, EEUU).

Secuencia	Th	Ciclos
F.- 5'-GGCATCTGTTCTGCTATTACGTG-3' R1.- 5'-ATCTTTTGGGTGCGATAATCC-3' R2.- 5'-GTGGATGTGGAATGTGTGCGAG-3'	58°C	33

Tamaños aparente de migración:

F1-R1	435		ratón MSTN ^{+/+}
F1-R2		285	ratón MSTN ^{-/-}
F1-R1-R2	435	285	ratón MSTN ^{+/-}

Tabla 2.- Características de la PCR (secuencias de los cebadores, temperatura de hibridación y ciclos) utilizada para el genotipado de los ratones y tamaño aparente de migración.

Para la realización de los tratamientos *in vivo* se utilizaron G-CSF (Neupogen, 250 µg/kg/día, s.c.) o EPO (NeoRecormon 3000 U, 25 U/kg/día, s.c.). En ambos casos los tratamientos duraron 7 días.

3.1.1. Recuentos hematológicos

Los recuentos hematológicos se realizaron tanto de forma manual, mediante análisis microscópico de extensiones de sangre periférica, como de forma automática por medio de un autoanalizador hematológico citoquímico ADVIA 120 (Siemens, Munich, Alemania). Para el realizar el recuento manual se utilizó el método de Wright modificado, tiñendo las extensiones con Hema-TEK slide stainer (Siemens). Dado que para la realización del recuento celular utilizamos un sistema automático diseñado para el recuento de los valores hematológicos humanos, realizamos un estudio preliminar para validar el uso de ese sistema en muestras de sangre murina. Para ello, comparamos los resultados obtenidos, en el mismo animal, mediante recuento manual de leucocitos en extensiones y mediante recuento automático. Los resultados de este estudio muestran que no existen diferencias significativas entre estos dos sistemas de recuento (figura 8).

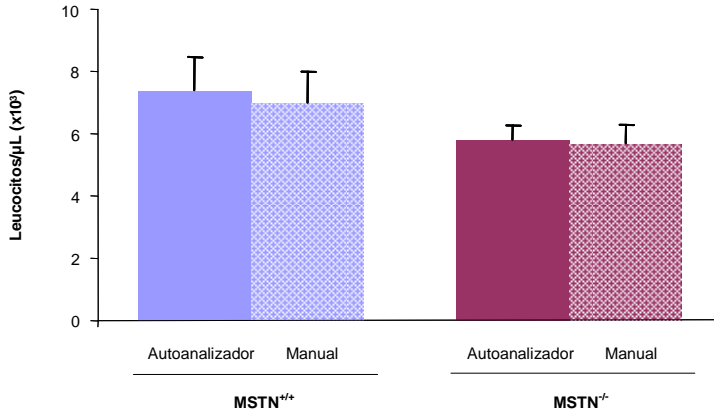


Figura 8.- Validación del sistema de recuento de células hemáticas. No existen diferencias significativas al comparar los resultados obtenidos en el recuento de leucocitos mediante extensiones de sangre periférica y autoanalizador hematológico histoquímico. Los resultados se muestran como la media \pm EEM de 12 determinaciones ($p = NS$).

3.1.2. Ensayos de maduración de granulocitos

Para evaluar los efectos del tratamiento con G-CSF *in vivo* se realizó una citometría empleando los anticuerpos anti-Gr-1 FITC y anti-Mac-1 PE (eBioscience, San Diego, EEUU). Gr-1 es una proteína anclada al glucosilfosfatidilinositol que se expresa en granulocitos de médula ósea y en neutrófilos periféricos. Mac-1 (integrina $\alpha M \beta 2$) se forma por la asociación de CD11b (integrina αM) con CD18 (integrina $\beta 2$). Se expresa en neutrófilos, células NK, monocitos y macrófagos. El anticuerpo utilizado está dirigido contra la subunidad CD11b.

3.1.3. Ensayos de células de ratón formadoras de colonias

Las muestras de médula ósea se extrajeron del fémur. Tras aislar quirúrgicamente el fémur y seccionar las epífisis, se perfunde el interior de la diáfisis con 1-3 mL de medio de cultivo (Iscove's MDM, StemCell Technologies,

Vancouver, Canadá) a 4°C. Una vez extraída la médula, se siembra inmediatamente a una concentración de 2×10^5 células/placa para CFU-E y BFU-E y 2×10^4 células/placa para CFU-GM. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% CO₂ y 95% de humedad. Para los ensayos de CFU-E y BFU-E se utilizó el medio M3334 (StemCell Technologies) y los cultivos se mantuvieron durante 2 días para CFU-E y 3- 4 para BFU-E. Para ensayos de CFU-GM se empleó el medio M3434 (StemCell Technologies) y los cultivos se mantuvieron de 7 a 10 días.

3.2. Líneas celulares

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo en las líneas celulares HL60, Jurkat y K562 (ECACC, *European Collection of Cell Culture*, Wiltshire, Reino Unido). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma, Saint Louis, EEUU) complementado con suero fetal bovino (10%), glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/mL) y estreptomycin (100 mg/mL), a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. La concentración a la que se mantienen estas líneas es de 10^5 a 10^6 células/mL para evitar que las células se diferencien espontáneamente.

3.2.1. Proliferación

En los ensayos de proliferación las células se sembraron por triplicado 10^5 células en placas de 15 mm de diámetro. El número de células se determinó mediante recuento en una cámara Neubauer, y el ciclo celular mediante citometría de flujo (FacScan, BD Pharmingen, New Jersey, EEUU) de células teñidas con yoduro de propidio. El análisis de las poblaciones obtenidas se realizó con el software CellQuest (BD Pharmingen).

3.2.2. Apoptosis

La apoptosis se determinó mediante citometría de flujo y por tinción de los núcleos celulares con bisbenzamida. Para realizar la tinción con bisbenzamida y el marcaje de las células, se sembraron por triplicado 3×10^5 células en placas de 15 mm de diámetro. Las células se incubaron durante 24 horas en medio sin suero en presencia de 125 ng/mL de MSTN recombinante o vehículo. Después de un periodo adicional de incubación de 24, 48, 72 y 96 horas, las células se tiñeron con bisbenzamida 50nM (Hoechst 33258, Sigma) y se fotografiaron con una magnificación de 100X tres campos aleatorios de cada uno de los replicados, con una cámara digital DP10 (Olympus Optical, Tokio, Japón). En paralelo, las células se incubaron con anexina V-FITC y yoduro de propidio-PE, de acuerdo con las instrucciones del "FITC Annexin V apoptosis detection Kit I" de BD Pharmingen. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software ModFit para Mac V3.0 (BD Pharmingen). En el caso de las células K562 el estudio se realizó empleando Trypan Blue (Sigma), en lugar de bisbenzamida. Se realizan las mismas condiciones de siembra que en el caso del ensayo con bisbenzamida, transcurridas 96 horas de incubación se prepara suspensión celular en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen, Carlsbad, EEUU) y se transfieren 0,5 mL de solución de Trypan Blue (0,4% peso/volumen) a un tubo. Finalmente se añaden 0,3 mL de HBSS y 0,2 mL de la suspensión celular y se incuban 5-15 minutos a temperatura ambiente.

3.2.3. Diferenciación

Para analizar el efecto del tratamiento con MSTN sobre la diferenciación celular, se sembraron por triplicado 4×10^5 células en placas de 35 mm de diámetro y se incubaron con medio con suero fetal bovino al 10%. Transcurridas 5 horas se tratan con 125 ng/mL de MSTN o vehículo (R&D Systems, Minneapolis, EEUU). Para analizar la diferenciación de células HL60 se determinó la expresión del antígeno CD33 por medio de citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal acoplado a FITC (BD Pharmingen). En el

caso de las células HL60 se estudiaron, además, los cambios fenotípicos inducidos por el tratamiento mediante tinción con el método de Wright modificado. Para ello las células se depositaron en un portaobjetos por centrifugación (citospin) y, posteriormente, se tiñeron con el Hema-TEK slide stainer (Siemens) y se observaron al microscopio. Como control positivo se utilizaron células tratadas con DMSO (1,3%) o con TPA (10 nM). En el caso de las células K562 se realizó mediante tinción con bencidina (1,5 mg/ml, 25 µl de H₂O₂ al 30% y 50 µl de ácido acético glacial) que permite detectar la presencia de hemoglobina (Hb) en las células. La cuantificación de las células positivas se realizó en una cámara de Neubauer.

3.3. RT-PCR

El análisis semicuantitativo de los diferentes transcritos de mRNA se realizó mediante RT-PCR. En la tabla 3 se muestran las secuencias de los diferentes cebadores, las temperaturas de hibridación utilizadas y el tamaño de los productos obtenidos.

cDNA	Secuencia	Th	Ciclos	Peso ^(*) (pb)
h-HPRT	F.- 5'-CAGCCCTGCCGTCGTGATTA-3' R.- 5'-AGCAAGACGTTTCAGTCCTGTC-3'	58°C	28	138
h-MSTN	F.- 5'-GCACTGGTATTTGGCAGAGCA-3' R.- 5'-CACACTCTCCAGAGCAGTAAT-3'	58°C	32	345
h-ALK4	F.- 5'-CCCTCTTTGTCCAGCGCACAG-3' R.- 5'-ATCAAAACAGGGACCCTGCTCAT-3'	58°C	28	267
h-Act RIIA	F.- 5'-TACTGCTGCAGATGGACCTG-3' R.- 5'-AGCTCCAGTTCAGAGTCCCA-3'	64°C	26	388
h-Act RIIB	F.- 5'-ACACGGGAGTGCATCTACTACAA-3' R.- 5'-GGCAAATGAGTGAAGCGCTCGTT-3'	64°C	30	252
HPRT	F.- 5'-CAGTCCCAGCGTCGTGATTA-3' R.- 5'-AGCAAGTCTTTCAGTCCTGTC-3'	58°C	28	139
r- MSTN	F.- 5'-GCACTGGTATTTGGCAGAGTA-3' R.- 5'-CACACTCTCCTGTGCAGTAAT-3'	58°C	32	345
r- ALK4	F.- 5'-CTGGATGGCGTGGAGCACCC-3' R.- 5'-GTTGATGACCAGGAAGACGATG-3'	60°C	32	275
r- Act RIIA	F.- 5'-CAGGTGCTATACTTGGCAGA-3' R.- 5'-TTCCTGCAATTAACATTAGTGG-3'	60°C	32	405
r-Act RIIB	F.- 5'-GCAGGAGTGTGTGGCCACCG-3' R.- 5'-TGGCTTCAGGCCACCAGAG-3'	60°C	32	304

Tabla 3.- Características (secuencias de los cebadores, temperatura de hibridación y tamaño del producto PCR) de las distintas RT-PCRs realizadas. ^(*) Peso se refiere al tamaño aparente de migración.

El RNA utilizado como molde en la RT-PCR fue aislado de tejido o de células empleando el reactivo TRIZOL (Invitrogen). Para la obtención de RNA de sangre humana se utilizó el kit QIAamp®RNA Blood (Qiagen, Hilden, Alemania). En la reacción de síntesis del cDNA se emplearon 1 µg de RNA total y 200 U de la transcriptasa reversa del M-MLV (Moloney-Murine Leukemia Virus, Invitrogen). La reacción se llevó a cabo durante 1 hora a 37°C y 5 min a

95°C, en una mezcla de reacción de 30 µl con la siguiente composición: Tris-HCl (pH 8,3) 50 mM, MgCl₂ 5,5 mM, 0,5 mM de cada dNTP, 40 U del inhibidor de RNAsas RNaseOUT (Invitrogen) y 1,7 µg/µl de oligonucleótidos hexaméricos de secuencia aleatoria (Invitrogen). A continuación, una alícuota de 3 µl de la reacción de transcripción reversa fue amplificada por PCR con 1,25 U de Taq polimerasa (Invitrogen) en 50 µl de una reacción compuesta por Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,2 mM de cada dNTP y 0,4 µM de cada uno de los cebadores. Como control de carga se empleó el gen de la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (*Hypoxanthine guanine PhosphoRibosyl Transferase*, HPRT). Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio en el sistema digital de análisis de imagen GelDoc 1000 (Bio-Rad).

3.4. Western blot

Los extractos celulares se incubaron con un tampón de lisis (RIPA) compuesto por PBS (9,1 mM de fosfato sódico dibásico, 1,7 mM fosfato sódico monobásico y 150 mM NaOH, ajustando el pH a 7,4 con NaOH), 0,5% deoxicolato sódico y 0,1% SDS. Como inhibidores de proteasas se utilizaron PMSF (10 mg/mL en isopropanol), aprotinina (30 µl/mL) y ortovanadato sódico (100 mM). En todos los casos, la cantidad total de proteína extraída fue determinada por espectrofotometría utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

Las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman, Maidstone, Reino Unido). Posteriormente, las membranas se bloquearon a 4°C toda la noche en tampón Tris salino (TBS) con Tween-20 (0,1%) y caseína (0,2%). La incubación con anticuerpos primarios se realizó, dependiendo del anticuerpo, a temperatura ambiente durante 1 hora o toda la noche a 4°C. Tras la incubación, las membranas se lavaron con TBS con 0,1% de Tween-20. Para la detección de los anticuerpos primarios se utilizó proteína A acoplada a peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania) o secundarios frente

antígeno de conejo o ratón, a una dilución de 1:1000 a 1:5000, dependiendo del anticuerpo secundario que se utilice. Tras la última serie de lavados, la actividad peroxidasa se detectó con el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham Pharmacia Biotech) seguido de la exposición y revelado de una película fotográfica. En la tabla 4 se muestran las principales características de los distintos anticuerpos utilizados.

Anticuerpo primario	Dilución	Peso (kDa)	Casa comercial
Anti-MSTN	1:5000	25	Cedido por el Dr. Cadavid
Anti-pSmad2	1:1000	60	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Anti-Smad2	1:1000	58	Cell Signaling
Anti-Tubulina	1:5000	55	Sigma
Anti-p21	1:1000	21	Santa Cruz, California, USA
Anti-p27	1:1000	27	Santa Cruz
Anti-pERK (p-p44/p-p42)	1:1000	44, 42	Cell Signaling
Anti-ERK	1:1000	45	Cell Signaling
Anti-p38-MAPK	1:1000	43	Cell Signaling

Tabla 4.- Características de los anticuerpos primarios utilizados para la realización de los *western blot*. Se muestra también los pesos aparentes de cada una de las bandas detectadas.

3.5. Inmunocitoquímica

Las células se recogieron mediante citospin en portaobjetos estériles recubiertos con poli-L-lisina (FLEX IHC microscope slides, Dako, Glostrup, Dinamarca) y se fijaron con etanol al 96% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para incrementar la exposición del antígeno, los portaobjetos se sumergieron en tampón citrato sódico (10 mM, pH 6) y se calentaron en microondas (H2800 Microwave Processor, EBSciences) a 750 vatios durante 20 minutos. Una vez enfriados, los portaobjetos se lavan dos veces en TBS y se

incubaban con el anticuerpo anti-MSTN (dilución 1:200) durante toda la noche a 4°C. El exceso de anticuerpo se elimina realizando dos lavados con TBS durante 5 minutos. Como sistema de detección se utilizó el EnVision Detection Kit (Dako). La actividad peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación con solución de bloqueo (Dako) durante 10 minutos. Los controles negativos se realizaron mediante preincubación del anticuerpo primario con su antígeno en agitación, durante toda la noche a 4°C

4. RESULTADOS

4.1. La miostatina y su sistema de receptores se expresan en células hemáticas

4.1.1. Expresión de MSTN en células hemáticas

Aunque la MSTN se expresa predominantemente en el músculo esquelético, existen diversos estudios que demuestran la existencia de expresión de MSTN en otros tejidos como músculo cardíaco³⁷⁻⁴³, tejido adiposo^{29,33,45,172}, glándula mamaria⁴⁶, hueso⁴⁷, cerebro^{173,174}, útero⁵⁰⁻⁵² y testículos⁵⁰. Los resultados obtenidos demuestran que la MSTN se expresa también en células de estirpe hematopoyético (figura 9). Mediante RT-PCR hemos podido comprobar la presencia de mRNA de MSTN en muestras de sangre periférica humana (figura 9A). Los estudios inmunocitoquímicos mostraron la existencia de inmunoreactividad anti-MSTN tanto en granulocitos como en linfocitos. Sin embargo, no detectamos la presencia de MSTN en eritrocitos (figura 9B-E).

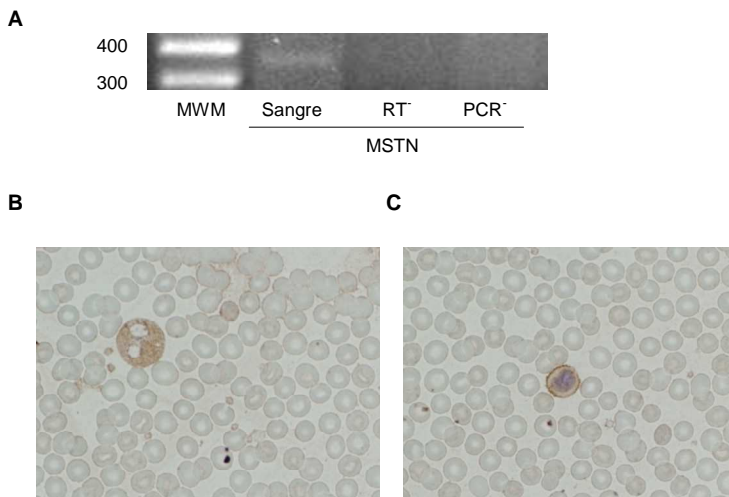


Figura 9.- La MSTN se expresa en células hemáticas. **A.-** RT-PCR (HPRT: 28 ciclos, MSTN: 35 ciclos) de RNA extraído de células de sangre periférica de humano empleando el kit de Qiagen para aislamiento de RNA total de sangre. **B-C.-** Inmunocitoquímica de extensiones de sangre periférica humana. Las células se depositaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se fijaron con etanol y se incubaron con el anticuerpo anti-MSTN (dilución 1:200) durante toda la noche a 4°C. Como sistema de detección se utilizó el EnVision Detection Kit (Dako). La expresión de MSTN se detectó en granulocitos (B) y en linfocitos (C), pero no se detectó inmunoreactividad anti-MSTN en eritrocitos (40X).

4.1.2. Expresión de MSTN en líneas celulares hematopoyéticas

Con el objetivo de poder analizar el papel funcional de la MSTN en células hemáticas, utilizamos 3 líneas celulares de estirpe hematopoyético (HL60, Jurkat y K562) y, como primer paso, investigamos si estas líneas celulares eran también capaces de expresar MSTN. Mediante RT-PCR se pudo comprobar la presencia de mRNA de MSTN en 2 de las 3 líneas celulares estudiadas (HL60 y Jurkat). Por el contrario, no encontramos expresión de MSTN en células K562 (figura 10). Estos resultados se corroboraron al analizar la presencia de proteína mediante *western blot* e inmunocitoquímica. El *western blot* demostró la presencia de una banda de aproximadamente 25 kDa en los dos tipos celulares en los que habíamos detectado la presencia del mensajero, pero no en células K562. Resultados similares se obtuvieron mediante inmunocitoquímica, que mostró la presencia de inmunorreactividad anti-MSTN únicamente en células HL60 y Jurkat. Esta inmunorreactividad se concentraba en áreas próximas a la membrana plasmática y, sobre todo, en regiones vecinas a otras células, lo que podría estar relacionado con la participación de la MSTN en procesos de regulación paracrina.

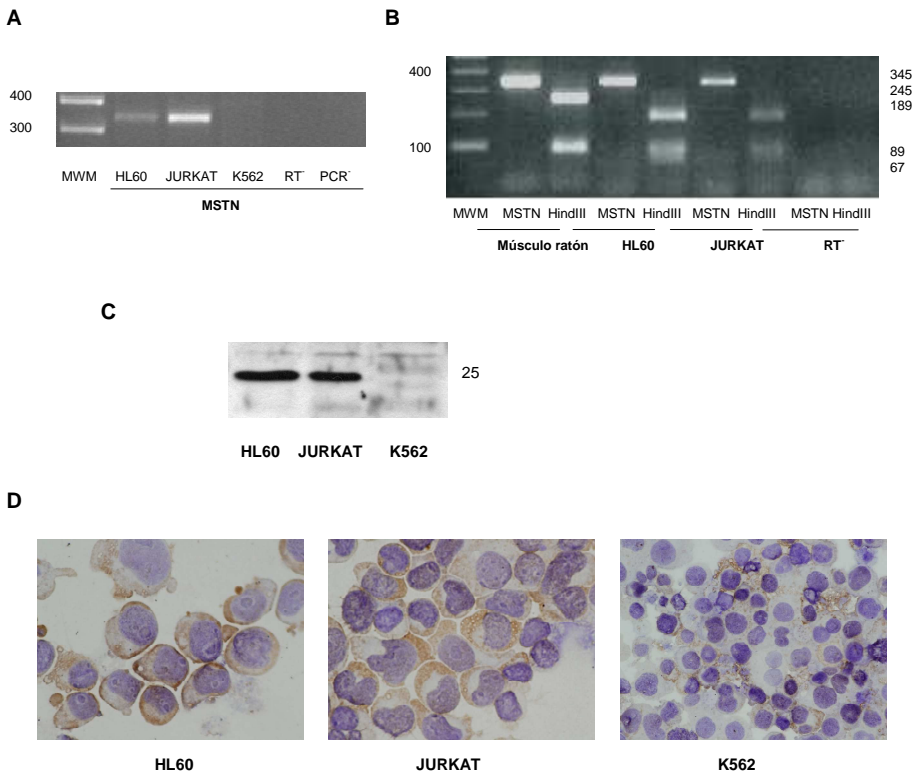
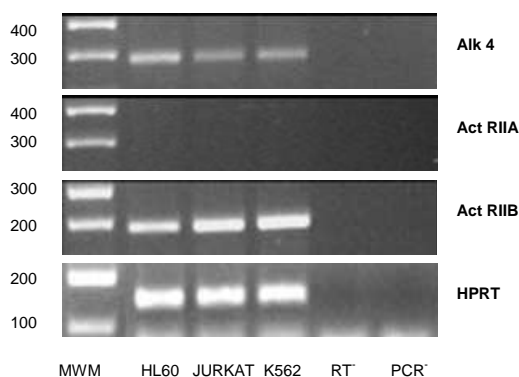


Figura 10.- La MSTN se expresa en líneas celulares hematopoyéticas. **A.-** RT-PCR (HPRT: 28 ciclos, MSTN: 35 ciclos) de mRNA extraído de líneas celulares hematopoyéticas humanas cultivadas en RPMI 1640 a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. **B.-** Ensayo de restricción. Para comprobar la identidad de los productos amplificados, se incubaron con HindIII durante 2 h a temperatura ambiente. Como control positivo se utilizó músculo de ratón. **C.-** *Western blot* de extractos celulares obtenidos por incubación con tampón de lisis (RIPA). Las muestras se resolvieron mediante de SDS-PAGE al 12%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con el anticuerpo específico anti-MSTN (1:5000) a 4°C toda la noche. **D.-** Inmunocitoquímica. Las células se depositaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina mediante citospin, se fijaron con etanol y se incubaron con el anticuerpo anti-MSTN (dilución 1:200) durante toda la noche a 4°C. Como sistema de detección se utilizó el EnVision Detection Kit (Dako) (40X).

Una vez demostrada la expresión de MSTN, nuestro siguiente objetivo fue analizar la presencia de receptores de MSTN funcionales en estas células. En la mayor parte de los casos, el receptor tipo II utilizado por la MSTN es Act-RIIB, mientras que el principal receptor tipo I encargado de transmitir su señal

es Alk4⁶². En los tres tipos celulares estudiados fue posible detectar la presencia de mRNA de Act-RIIB y Alk4, aunque no de Act-RIIA (figura 11 A), lo que permite aventurar que la MSTN es capaz de ejercer sus acciones en estas células.

A



B

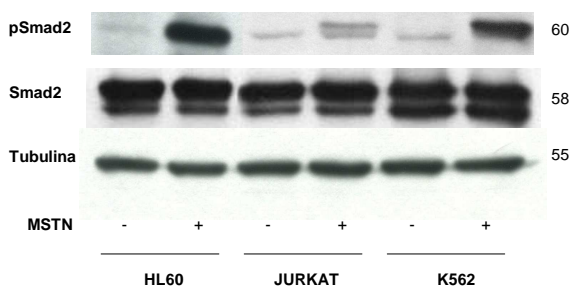
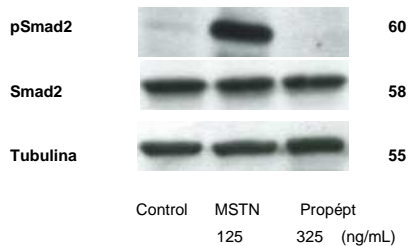


Figura 11.- Las líneas celulares hematopoyéticas expresan receptores de MSTN funcionales. **A.-** RT-PCR (HPRT: 28 ciclos, ALK4: 28 ciclos, Act-RIIA: 26 ciclos, Act-RIIB: 30 ciclos) de mRNA extraído de líneas celulares hematopoyéticas humanas cultivadas en RPMI 1640, a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. **B.-** Western blot de extractos celulares obtenidos por incubación con tampón de lisis (RIPA). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 en condiciones de serodeprivación durante 24h y se trataron con MSTN (125 ng/mL) o vehículo durante 15 minutos. Los extractos celulares se resolvieron mediante de SDS-PAGE al 8%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con los anticuerpos anti-fosfoSmad2 (1:1000, toda la noche a 4° C), anti-Smad2 (1:1000, 1 h a temperatura ambiente) y anti-tubulina (1:5000, 1 h a temperatura ambiente).

En la mayor parte de las células, la activación del complejo de receptores de MSTN (Act-RIIB-Alk4) induce la fosforilación de Smad2 que es la principal Smad implicada en la transmisión de señales de la MSTN. De acuerdo con esto, el tratamiento de células HL60 y K562 con MSTN produjo un marcado incremento de los niveles de fosfo-Smad2 detectados mediante *western blot* (figura 11B), lo que demuestra que los receptores de MSTN detectados en estas células son funcionales. Por el contrario, pese a que las células Jurkat expresan niveles similares de ActRIIB, Alk4 y Smad2, el tratamiento de estas células con MSTN apenas incrementó los niveles de Smad2 fosforilada detectados.

Mediante estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha podido comprobar que el fragmento N-terminal de la MSTN (propéptido) desempeña un papel fundamental en la regulación de la actividad biológica de la hormona. Por tanto, para comprobar la especificidad de la activación observada, tratamos células HL60 con distintas concentraciones del propéptido y estudiamos su efecto sobre la fosforilación de Smad2 inducida por MSTN. Como puede apreciarse en la figura 12, la presencia del propéptido produjo una disminución dosis-dependiente de la fosforilación de Smad2 inducida por MSTN.

A



B

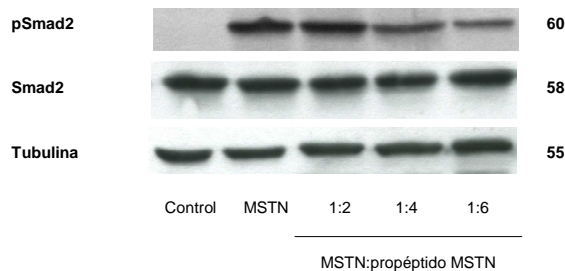


Figura 12.- El bloqueo de la MSTN con su propéptido disminuye la fosforilación de Smad2 en células HL60. **A, B.-** *Western blot* de extractos celulares obtenidos por incubación con tampón de lisis (RIPA). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 en condiciones de serodeprivación durante 24 h y se trataron con MSTN (125 ng/mL) y con distintas concentraciones del propéptido durante 15 minutos. Las células control fueron tratadas con vehículo. Los extractos celulares se resolvieron mediante de SDS-PAGE al 8%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con los anticuerpos anti-fosfoSmad2 (1:1000, toda la noche a 4°C), anti-Smad2 (1:1000, 1 h a temperatura ambiente) y anti-tubulina (1:5000, 1 h a temperatura ambiente).

4.2. Acciones de la miostatina en células hematopoyéticas

A fin de estudiar los posibles efectos biológicos de la MSTN en células hematopoyéticas, las tres líneas celulares investigadas se trataron con MSTN y se analizaron los efectos sobre proliferación, diferenciación y supervivencia celulares.

4.2.1. HL60

Dado que, en células musculares, uno de los principales efectos de la MSTN es regular la diferenciación de mioblastos a miocitos, estudiamos en primer lugar el efecto del tratamiento con MSTN sobre la diferenciación de las células HL60. La capacidad de las células HL60 de diferenciarse *in vitro* en respuesta a diferentes estímulos está perfectamente documentada en la literatura. Dos de los estímulos clásicos utilizados son el DMSO y el TPA que se caracterizan por inducir una disminución de la expresión de CD33¹⁷⁵. De acuerdo con estos estudios, tanto el tratamiento con DMSO como con TPA produjo una disminución de la expresión de CD33 con respecto al basal (tabla 5). También de acuerdo con los datos existentes en la literatura¹⁷⁶, esta disminución de la expresión de CD33 se acompañó de cambios fenotípicos característicos entre los que se incluye un marcado aumento de la capacidad de adhesión a la placa de cultivo en el caso de las células tratadas con TPA (figura 13B), o la presencia de núcleos polilobulados en células tratadas con DMSO (figura 13E). De forma similar, el tratamiento con MSTN produjo una

disminución de la expresión de CD33 en estas células (tabla 5), junto con la aparición de cambios morfológicos similares a los observados al inducir la diferenciación mediante tratamiento con DMSO (figura 13F). Además, el tratamiento con MSTN fue capaz de incrementar el efecto diferenciador inducido por el DMSO, mientras que apenas modificó los resultados obtenidos tras el tratamiento con TPA (tabla 5). En conjunto, estos resultados sugieren que MSTN estimula la diferenciación de células HL60 a través de un mecanismo similar al utilizado por el DMSO. En este sentido, es importante destacar que el proceso de diferenciación inducido por DMSO se acompañó de un aumento de la fosforilación de Smad2, que no se observó cuando la diferenciación se indujo mediante tratamiento con TPA (figura 13G).

TPA (10 nM)	29,4± 1,5*
DMSO (1,3%)	9,7± 0,7*
MSTN (125 ng/mL)	5,1 ± 0,6*
Propéptido (325 ng/mL)	0,9 ± 0,3
TPA (10 nM) + MSTN (125 ng/mL)	36,2 ± 0,2 ^α
TPA (10 nM) + Propéptido (325 ng/mL)	28,9 ± 0,6
DMSO (1,3%) + MSTN (125 ng/mL)	23,6 ± 0,1#
DMSO (1,3%) + Propéptido (325 ng/mL)	11,5 ± 0,3

Tabla 5.- El tratamiento con MSTN estimula la diferenciación de células HL-60. Efecto del tratamiento con TPA (10 nM), DMSO (1,3%), MSTN (125 ng/mL), propéptido (325 ng/mL), TPA+MSTN, DMSO+MSTN, TPA+propéptido o DMSO+propéptido sobre la expresión de CD33. Los resultados se muestran como porcentaje de incremento con respecto al control (*= $p < 0,01$ vs. basal; ^α= $p < 0,01$ vs TPA; #= $p < 0,01$ vs DMSO).

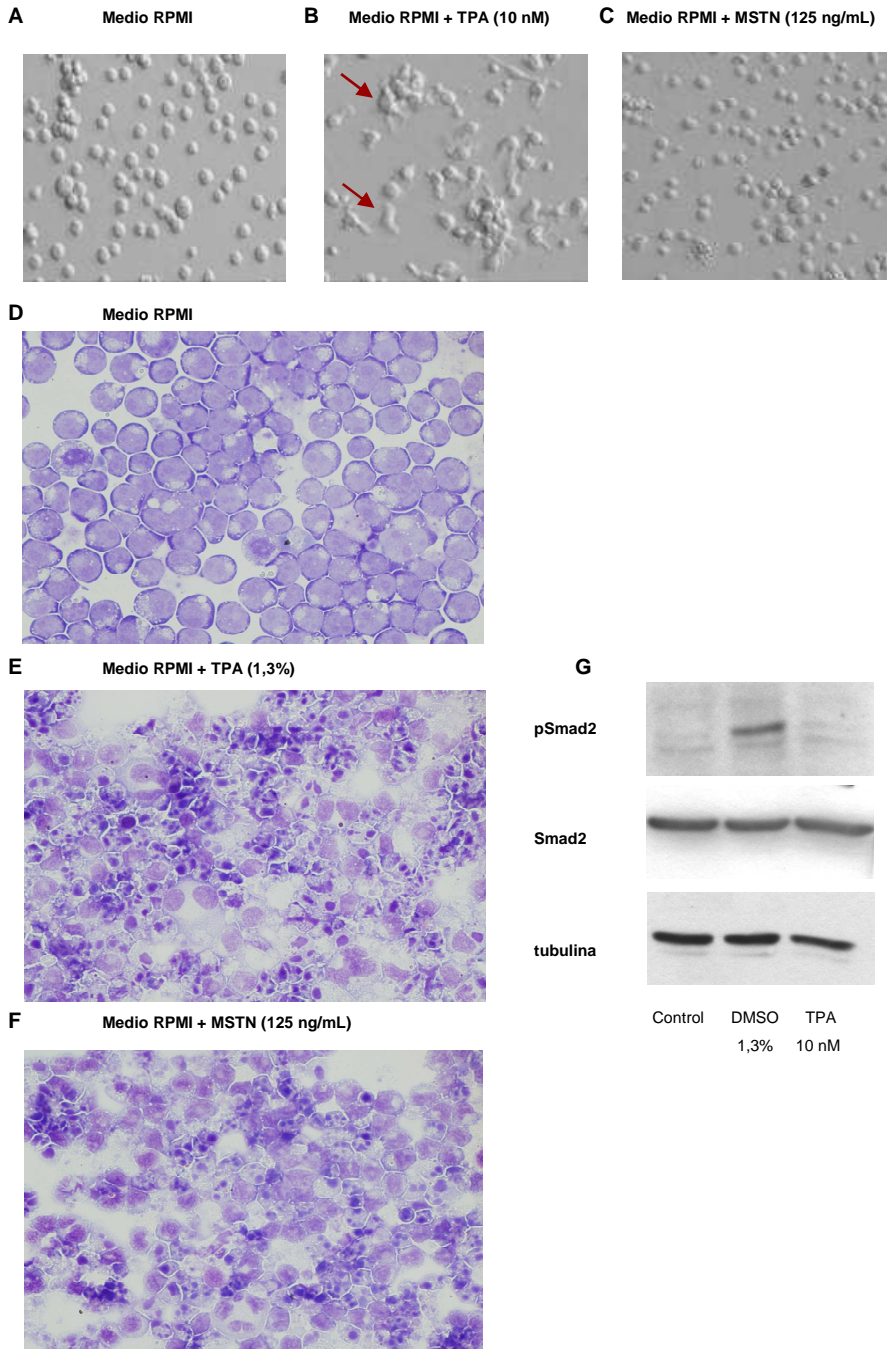
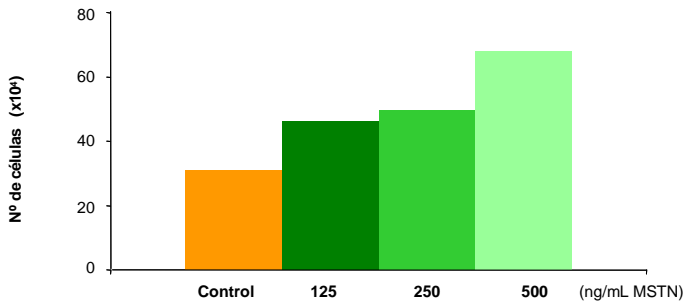


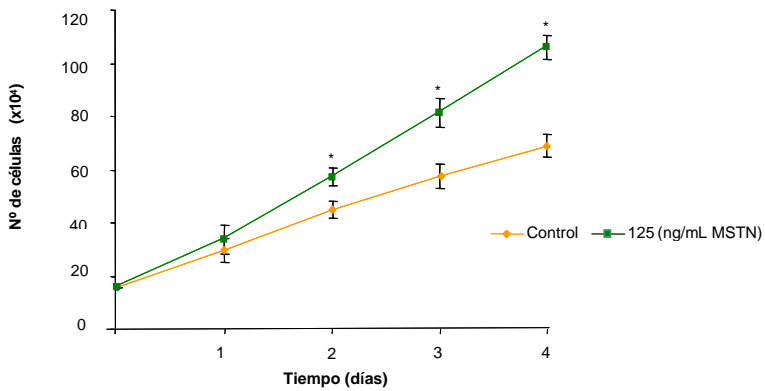
Figura 13.- El tratamiento con MSTN estimula la diferenciación de células HL-60. Las células se cultivaron en RPMI y se trataron con MSTN (125 ng/mL) durante 3 días. Como control positivo de diferenciación se utilizaron células tratadas con TPA (10 nM) o DMSO (1,3%), en ambos casos durante el mismo tiempo que el tratamiento de MSTN. Para valorar la diferenciación celular se analizaron los cambios en la morfología celular. **A-C.-** Comparación del efecto del tratamiento con TPA y el de MSTN. Las células se fotografiaron directamente en la placa de cultivo (10X). **D-F.-** Efecto del tratamiento con DMSO comparado con el de MSTN. Las células se depositaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina mediante citospin y se tiñeron con empleando el método Wright modificado (40X). **G.-** *Western blot* de extractos celulares obtenidos por incubación con tampón de lisis (RIPA). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 en condiciones de serodeprivación durante 24h y se trataron con TPA o DMSO. Las células control fueron tratadas con vehículo. Los extractos celulares se resolvieron mediante de SDS-PAGE al 8%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se incubó con los anticuerpos anti-fosfoSmad2 (1:1000, toda la noche a 4° C), anti-Smad2 (1:1000, 1 h a temperatura ambiente) y anti-tubulina (1:5000, 1 h a temperatura ambiente).

En segundo lugar, analizamos el efecto del tratamiento con MSTN sobre la proliferación y supervivencia celular. Como se puede observar en la figura 14 (A y B) las células HL60 responden al tratamiento con MSTN, pudiéndose observar un aumento en el número de células a partir del segundo día de tratamiento. Mediante el análisis del ciclo celular se pudo comprobar que este aumento del número de células no es debido a una estimulación de la proliferación, lo que sugiere un efecto sobre la supervivencia celular. Para comprobar esta posibilidad, investigamos el efecto del tratamiento con MSTN sobre el número de células apoptóticas presentes en el cultivo. Como puede observarse en la figura 14 (D y E), tanto los niveles de marcaje con anexina V detectados por citometría de flujo, como el número de células positivas a la tinción con Hoescht fueron significativamente inferiores en células tratadas con MSTN, en comparación con las células control. Al contrario de lo que ocurre con la MSTN, estas células no presentan ninguna respuesta al tratamiento con propéptido.

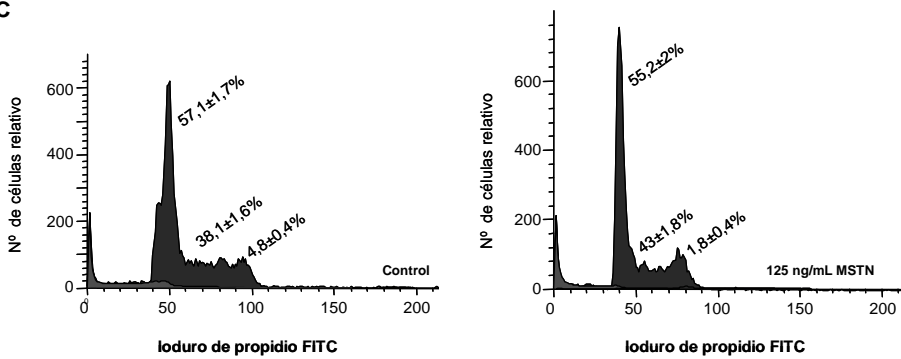
A



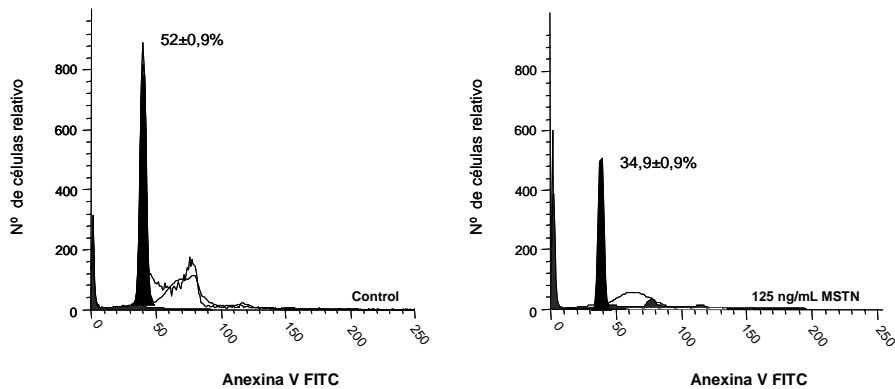
B



C



D



E

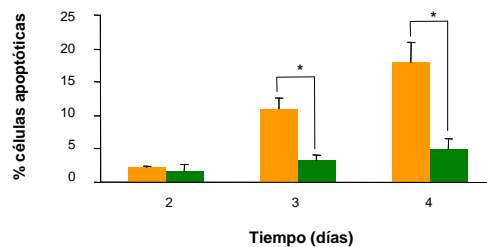


Figura 14.- El tratamiento con MSTN estimula la supervivencia de las células HL60, pero no modifica su tasa de proliferación. **A.-** Estudio dosis-respuesta del efecto del tratamiento con MSTN sobre el número de células. Se sembraron 10^5 células en placas de 15 mm de diámetro con medio RPMI con FBS al 10% y se trataron con distintas concentraciones de MSTN o con vehículo. Las células se contaron en una cámara de Neubauer al cabo de 72 h de tratamiento. **B.-** Estudio tiempo-respuesta del efecto del tratamiento con MSTN sobre el número de células. Las células se sembraron y cultivaron como en el apartado anterior, y se trataron con MSTN (125 ng/mL) o vehículo durante 96 h, contando el número de células cada 24 h. **C.-** Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo de células teñidas con ioduro de propidio. Las células se sembraron y cultivaron según se describe en el apartado A, y se analizó la distribución en las distintas fases del ciclo celular tras 96 h de tratamiento con MSTN (125 ng/mL) o vehículo. **D-E.-** Efecto del tratamiento con MSTN sobre la supervivencia celular. **(D)** Niveles de marcaje de anexina V determinados mediante citometría de flujo de células marcadas con anexina V-FITC y yoduro de propidio-PE tras 96 h de tratamiento. **(E)** Porcentaje de células apoptóticas determinado mediante tinción nuclear con Hoechst 33258. Las células apoptóticas se detectaron por la presencia de condensación nuclear y el mayor grado de fluorescencia. Todos los resultados se muestran como la media \pm EEM (*= $p < 0,01$ vs. control).

Dos de las vías más importantes implicadas en la regulación del crecimiento, diferenciación y supervivencia de células hematopoyéticas son las dependientes de la activación de ERK y de p38-MAPK¹⁷⁷⁻¹⁸⁰. Para comprobar si estas vías de señalización están también implicadas en el efecto de la MSTN en células HL60, analizamos la capacidad de esta hormona de inducir la fosforilación de ERK y de p38-MAPK. El tratamiento con MSTN produjo un incremento de fosforilación tanto de ERK como de p38-MAPK.

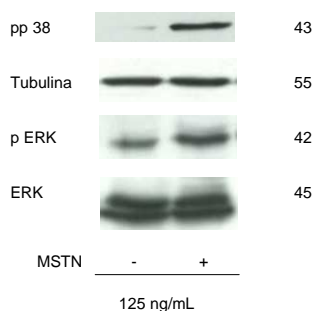


Figura 15.- El tratamiento con MSTN estimula la fosforilación de ERK y de p38-MAPK en células HL60. *Western blots* de extractos celulares obtenidos por incubación con tampón de lisis (RIPA). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con FBS al 10% y se trataron con MSTN (125 ng/mL) durante 96 h. Los extractos celulares se resolvieron mediante SDS-PAGE al 8% y se incubaron con los anticuerpos: anti-pp38-MAPK (1:1000, toda la noche a 4°C), anti-tubulina (1:1000, 1 h a temperatura ambiente), anti-pERK (1:1000, toda la noche a 4°C) y anti-ERK (1:1000, 1 h a temperatura ambiente).

4.2.2. JURKAT

Como señalamos anteriormente, a pesar de que estas células también expresan los receptores para MSTN como ocurre en las HL-60, el tratamiento con la hormona no es capaz de inducir la fosforilación de Smad2. En línea con este hallazgo, cuando tratamos las células Jurkat con la misma dosis de MSTN y durante el mismo tiempo que las HL-60, no se modificó el número de células. En conjunto, estos resultados sugieren que los receptores de MSTN presentes en las células Jurkat carecen de actividad funcional.

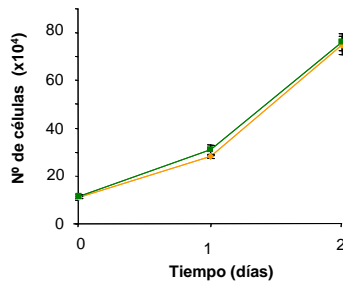


Figura 16.- El tratamiento con MSTN no modifica la tasa de crecimiento de las células JURKAT. Se sembraron 10^5 células en placas de 15 mm de diámetro con medio RPMI con FBS al 10% y se trataron con MSTN (125 ng/mL) o vehículo durante 48 h. El recuento celular se realizó cada 24 h en una cámara de Neubauer. Los resultados se muestran como la media \pm EEM ($p = NS$).

4.2.3. K562

Aunque las células K562 no expresan MSTN, decidimos estudiar el posible efecto del tratamiento con MSTN sobre su proliferación y diferenciación. Al igual que en el caso de las células HL60, en primer lugar estudiamos el efecto del tratamiento con MSTN sobre la diferenciación de esta línea celular. La diferenciación eritroide conlleva, entre otras características, cambios nucleares, pérdida de organelas y síntesis de Hb. Es en esta última característica en la que nos basamos para determinar la diferenciación que se produce al tratar las células K562. Para ello, identificamos las células diferenciadas mediante tinción con bencidina que produce una coloración azul cuando reacciona con la Hb. Al igual que ocurrió con las células HL60, el tratamiento con MSTN fue capaz de estimular la diferenciación de las células K562 (figura 17). Sin embargo, el efecto sobre el número de células fue opuesto al observado en las células HL60. A diferencia de lo observado en estas células, el número de células K562 descendió significativamente tras el tratamiento con MSTN (figura 18A). Esta disminución se acompañó con un descenso en el porcentaje de células viables, lo que sugiere que el tratamiento con MSTN disminuye la supervivencia de las células K562 (figura 18 B).

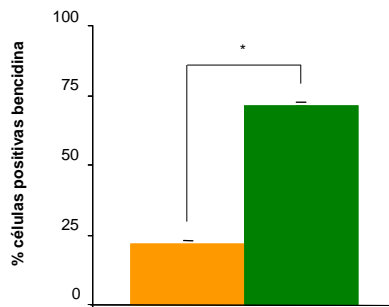


Figura 17.- El tratamiento con MSTN estimula la diferenciación de células K562. Se sembraron por triplicado 10^3 células en placas de 15 mm de diámetro y se incubaron durante 4 días en RPMI + FBS (10%), en presencia de MSTN (125 ng/mL) o vehículo. Al final del periodo de tratamiento, las células se tiñeron con bendicidina y se contaron en una cámara de Neubauer. Los resultados, se expresan como la media \pm EEM del porcentaje de células diferenciadas con respecto al total (* $p \leq 0,01$ vs. control).

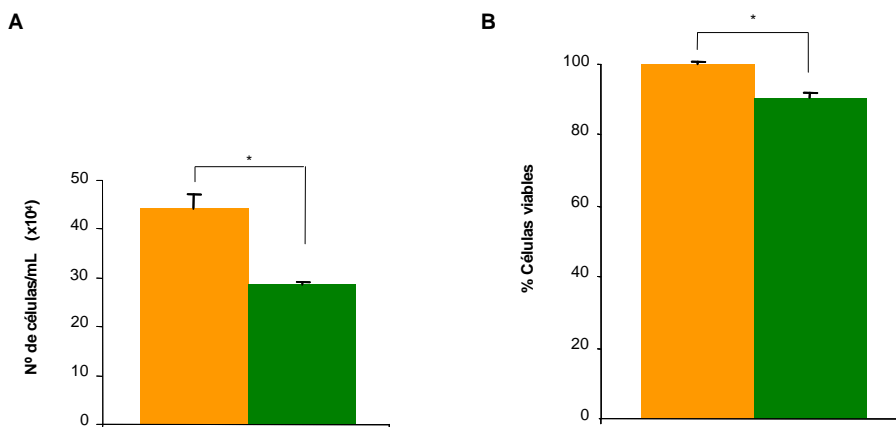


Figura 18.- El tratamiento con MSTN disminuye la supervivencia de células K562. Se sembraron por triplicado 10^3 células en placas de 15 mm de diámetro y se incubaron durante 3 días en RPMI + FBS (10%), en presencia de MSTN (125 ng/mL) o vehículo. **A.-** Efecto del tratamiento con MSTN sobre el número de células (determinado mediante recuento en una cámara de Neubauer). **B.-** Efecto del tratamiento con MSTN sobre la viabilidad celular. Las células se tiñeron con trypan blue y se contaron en una cámara de Neubauer. Los resultados se muestran como la media \pm EEM de los porcentajes de células viables con respecto al total (*= $p \leq 0,01$ vs. control).

También en este caso, el tratamiento con MSTN estimuló la fosforilación de p38-MAPK, pero sin modificar los niveles de fosforilación de ERK. Dado que

existen datos en la literatura que demuestran que la estimulación de p38-MAPK produce un incremento de la diferenciación eritroide^{177,181,182}, estos resultados podrían estar relacionados con la capacidad de la MSTN de estimular la diferenciación en estas células. Por otra parte, se ha visto que ERK desempeña un importante papel en la estimulación de la proliferación de células K562, por lo que la ausencia de estimulación de la fosforilación de esta proteína podría explicar, al menos en parte, la disminución del número de células K562 observada tras tratamiento con MSTN.

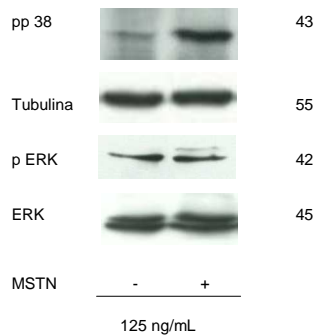


Figura 19.- El tratamiento con MSTN induce la fosforilación de p38-MAPK en células K562. *Western blot* de extractos celulares obtenidos por incubación con tampón de lisis (RIPA). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con FBS al 10% y se trataron con MSTN (125 ng/mL) durante 96 h.. Los extractos se resolvieron mediante SDS-PAGE al 8% y se incubaron con los anticuerpos: anti-pp38-MAPK (1:1000, toda la noche a 4°C), anti-tubulina (1:1000, 1 h a temperatura ambiente), anti-pERK (1:1000, toda la noche a 4°C) y anti-ERK (1:1000, 1 h a temperatura ambiente).

4.3. Acciones de la miostatina sobre la hematopoyesis *in vivo*

Una vez demostrado el efecto de la MSTN sobre células hematopoyéticas *in vitro*, decidimos analizar la posible participación de la hormona *in vivo*, por medio de la utilización de ratones MSTN^{-/-}.

Nuestro primer objetivo fue analizar la posible existencia de cambios en los distintos linajes hemáticos en sangre periférica de ratones MSTN^{-/-}. En todos

los rangos de edad estudiados (3, 6 y 12 meses) los ratones $MSTN^{-/-}$ presentaron un mayor número de leucocitos que los ratones $MSTN^{+/+}$. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas ni en el hematocrito ni en los niveles de Hb en ninguno de los grupos de edad (figura 20).

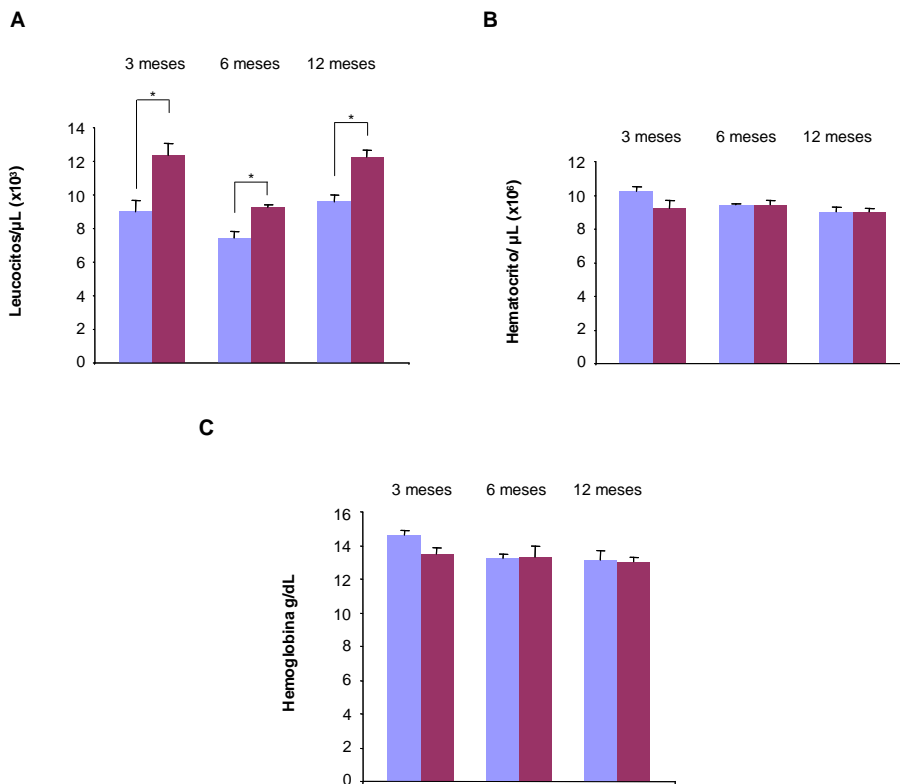


Figura 20.- Los ratones $MSTN^{-/-}$ presentan un aumento del número de leucocitos circulantes. La concentración de leucocitos (A), el hematocrito (B) y la concentración de Hb (C) en sangre periférica se determinaron en un autoanalizador hematológico citoquímico. Solo se observó aumento significativo en el número de leucocitos circulantes en ratones $MSTN^{-/-}$. Los resultados se muestran como media \pm EEM de 12 determinaciones ($*=p<0,01$).

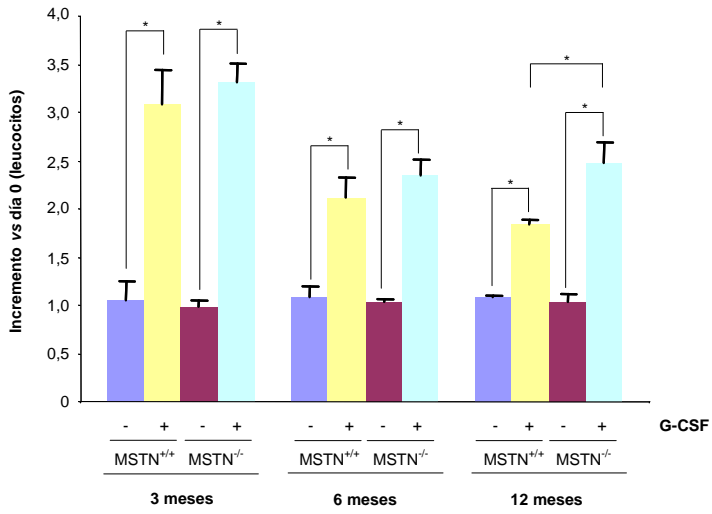
4.3.1. Papel de la MSTN en la granulopoyesis

Para analizar el posible papel de la MSTN en el proceso de granulopoyesis, se realizó un tratamiento con G-CSF en ratones de 3, 6 y 12 meses. El tratamiento con G-CSF produjo un incremento significativo del

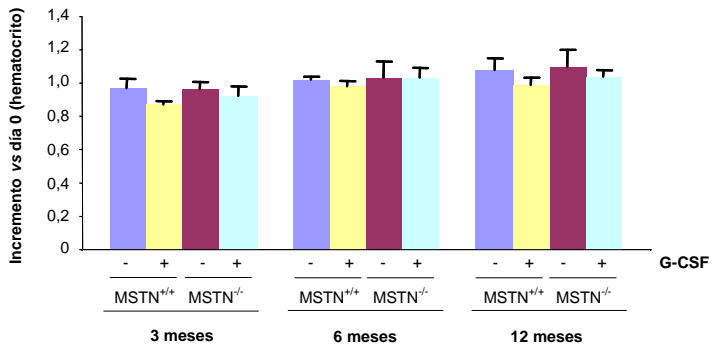
número de leucocitos circulantes tanto en ratones *knockout* como en ratones *wild type*, sin que se observen diferencias entre ambos fenotipos en la respuesta al tratamiento en los grupos de edad estudiados salvo en el grupo de 12 meses (figura 21A). No se observaron tampoco diferencias en el hematocrito tras administración de G-CSF en ninguno de los grupos estudiados (figura 21B). En cuanto a los niveles de Hb, el tratamiento con G-CSF produjo una disminución en ratones MSTN^{+/+} de 6 y 12 meses de edad. También se observó una ligera disminución de los niveles de Hb en ratones MSTN^{-/-} (figura 21C) en dichos grupos de edad, aunque en este caso, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

Sí observamos, por el contrario, diferencias en cuanto a la maduración a neutrófilos, analizada en función de los niveles de expresión de Gr-1 Mac-1 PE detectados por citometría. Como puede observarse en la figura 22, los ratones MSTN^{-/-} presentan un mayor grado de maduración de neutrófilos como respuesta a la administración de G-CSF que los ratones MSTN^{+/+} en los grupos de 3 y 12 meses.

A



B



C

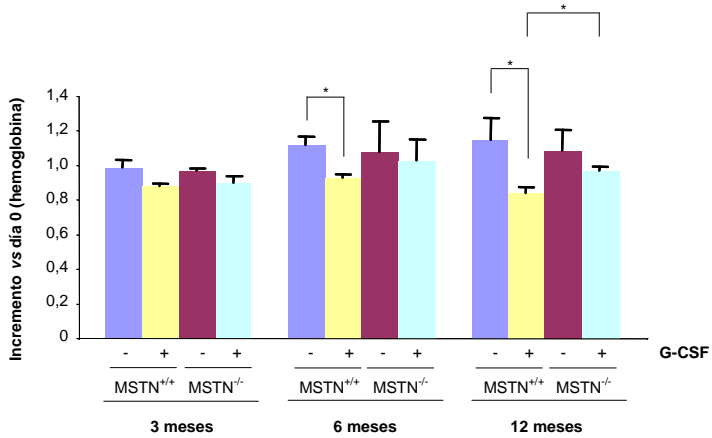


Figura 21.- El tratamiento con G-CSF provoca un aumento en el número de leucocitos circulantes. Se trataron ratones $MSTN^{+/+}$ y $MSTN^{-/-}$ con C-GSF (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, s.c.) durante 7 días, y se determinó la concentración de leucocitos (A), el hematocrito (B) y la concentración de Hb (C) en sangre periférica con un autoanalizador hematológico citoquímico. Los resultados se representan como media \pm EEM del incremento con respecto al basal en 6 animales en cada grupo ($*p<0,01$).

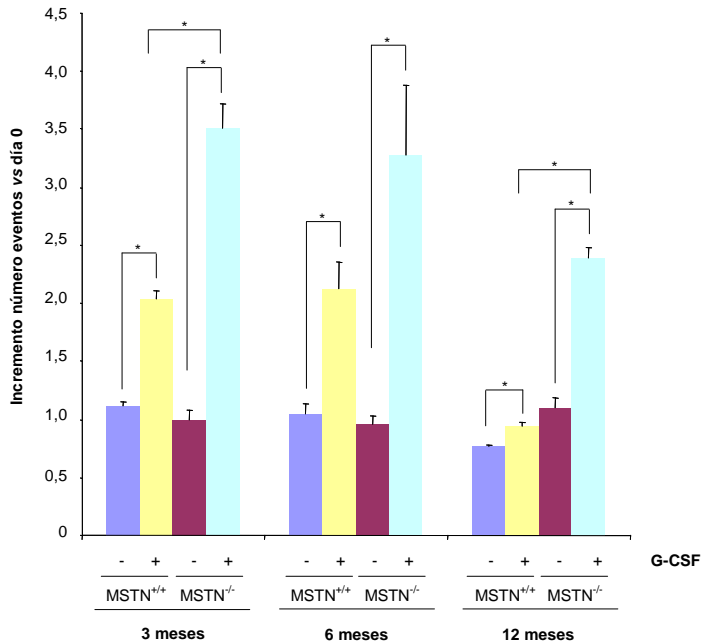


Figura 22.- El tratamiento con G-CSF provoca una estimulación de la maduración de neutrófilos. Se trataron ratones $MSTN^{+/+}$ y $MSTN^{-/-}$ con C-GSF (250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, s.c.) durante 7 días y se determinó la presencia de neutrófilos maduros en sangre periférica mediante citometría de flujo con los anticuerpos anti-Gr-1 FITC y anti-Mac-1 PE. Los resultados (anti-Gr-1/anti-Mac-1 $^{+/+}$) se representan como media \pm EEM del incremento con respecto al basal en 6 animales en cada grupo ($*p<0,01$).

4.3.2. Papel de la MSTN en la eritropoyesis

El tratamiento con EPO produjo un incremento significativo del número de glóbulos rojos y de la concentración de Hb tanto en ratones *knockout* como en ratones *wild type*, sin que se observen diferencias significativas entre ambos fenotipos en la respuesta al tratamiento en el grupo de edad estudiado (figuras 23A y B). Este efecto se vio acompañado de un aumento del porcentaje de reticulocitos en sangre periférica en ambos fenotipos, siendo este menor en el caso de *knockout* (figura 23C). El tratamiento con EPO produjo también una disminución en el número de leucocitos circulantes, que también fue similar en ambos fenotipos (figura 23D).

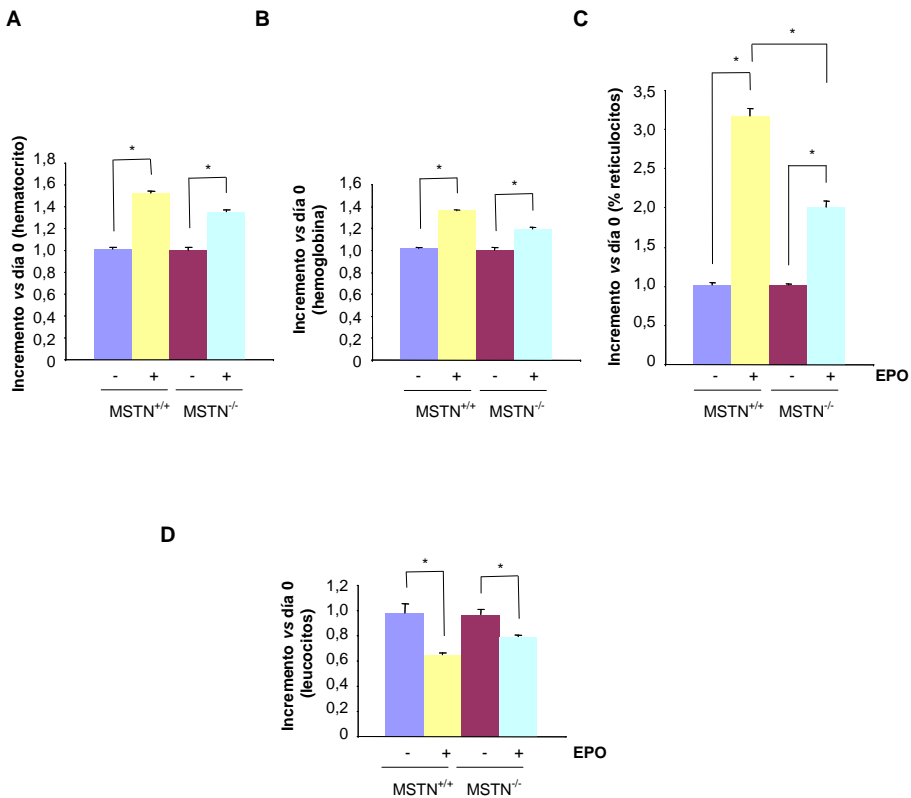


Figura 23.- El tratamiento con EPO estimula la eritropoyesis *in vivo* de forma similar en ratones MSTN^{+/+} y MSTN^{-/-}. Se trataron ratones MSTN^{+/+} y MSTN^{-/-} con EPO (25 U/Kg/día, s.c.) durante 7 días, y se determinó el hematocrito (A), la concentración de Hb (B), el número de reticulocitos (C) y el número de leucocitos (D), en sangre periférica con un autoanalizador hematológico citoquímico. Los resultados se representan como media ± EEM del incremento con respecto al basal en 6 animales en cada grupo (* $p < 0,01$).

El tratamiento con EPO también modificó la maduración de células hematopoyéticas de médula ósea *in vitro*. En ratones *wild type* el tratamiento con EPO potencia la formación de CFU-E y BFU-E. Sin embargo, en ratones *knockout* solo se produce esta potenciación en el caso de formación de CFU-E ya que la formación de BFU-E se ve significativamente disminuida en estos ratones (figura 24A y B). Estos datos apoyan la respuesta observada en el porcentaje de reticulocitos que se detecta en ambos fenotipos tras el tratamiento con EPO, existiendo como era de esperar un porcentaje menor en el caso de ratones *knockout*. Por el contrario, la administración de EPO, produjo una disminución del número de CFU-GM, tanto en ratones MSTN^{+/+} como en ratones MSTN^{-/-} (figura 24D), si bien en descenso fue significativamente menor en estos últimos.

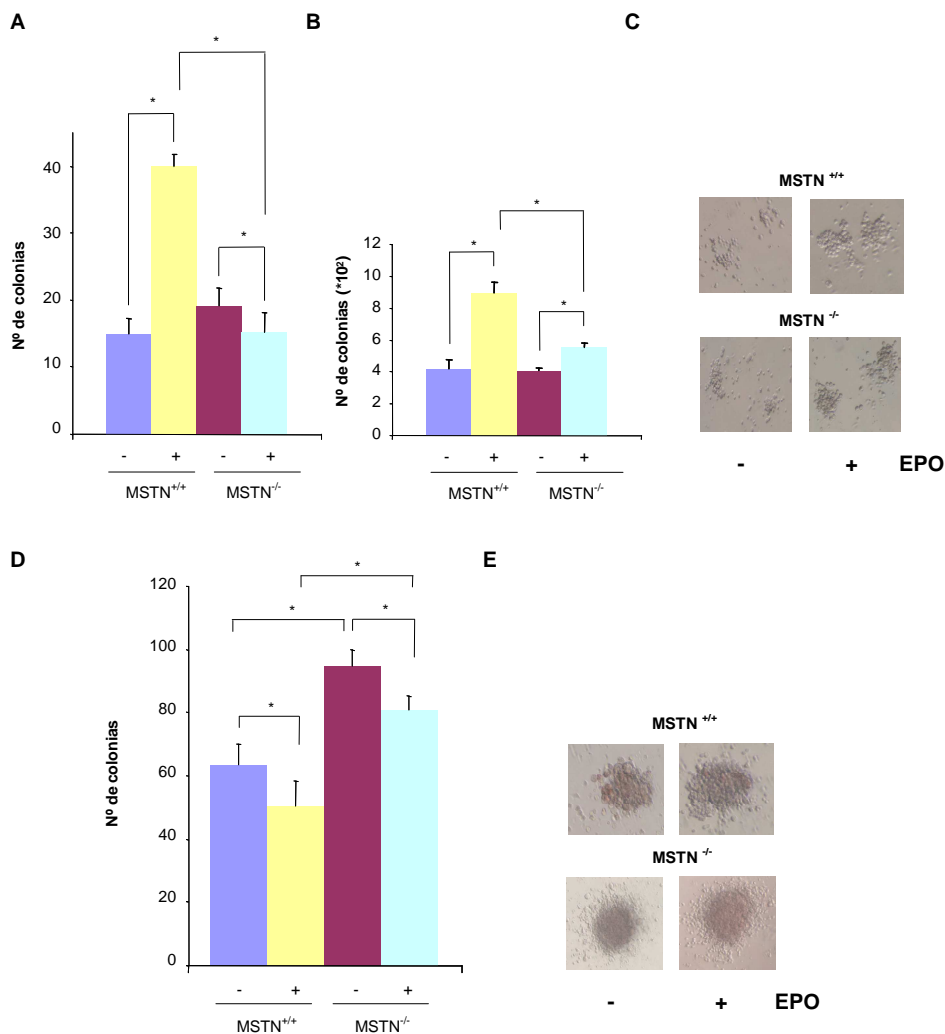


Figura 24.- La formación de colonias eritropoyéticas *in vitro* está disminuida en ratones MSTN^{-/-}, mientras que la formación de colonias granulopoyéticas *in vitro* está disminuida tanto en ratones MSTN^{+/+} como en MSTN^{-/-}. Para la realización de los ensayos de células formadoras de colonias (CFCs) se utilizaron muestras de médula ósea. **A-C.-** Las células se sembraron a una concentración de 2×10^5 células/placa en medio M3334. Los cultivos se mantuvieron durante 2 días para CFU-E y 3-4 para BFU-E. **(A)** Formación de colonias de CFU-E. **(B)** Formación de colonias de BFU-E. **(C)** Imágenes representativas de colonias BFU-E. **D y E.-** Las células se sembraron a una concentración de 2×10^4 células/placa en medio M3434 y se mantuvieron en cultivo durante 7-10 días. **(D)** Formación de colonias de CFU-GM. **(E)** Imágenes representativas de colonias CFU-GM. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales (*= $p < 0,01$).

5. DISCUSIÓN

Aunque la MSTN fue descrita originariamente como una proteína de expresión muscular, cada vez son más los estudios que demuestran la existencia de diversos tejidos capaces de sintetizarla. Uno de los primeros tejidos en los que se pudo demostrar la existencia de expresión de MSTN fue en el adiposo²⁹, donde podría actuar regulando, de forma local, la función de los adipocitos. Posteriormente, se pudo comprobar su expresión en tejido mamario⁴⁶, localizada principalmente en células epiteliales, habiéndose relacionado con la regulación de la diferenciación de la glándula; o en tejido cardíaco³⁷, en el que, la MSTN sintetizada por cardiomiocitos y células de Purkinje podría desempeñar algún papel en la regulación del desarrollo del corazón. Más recientemente, se ha encontrado también expresión de MSTN en útero^{51,52}, donde podría regular el desarrollo del miometrio y en placenta, en la que parece intervenir en la captación y transporte de nutrientes. Los datos mostrados en el presente estudio demuestran que determinados tipos de células hematopoyéticas son también capaces de sintetizar MSTN, lo que, unido a la presencia de receptores de ésta funcionales, abre una nueva posibilidad, la de que la MSTN esté también implicada en el control de la hematopoyesis.

La hematopoyesis es un proceso complejo, en el cual se van a originar diferentes linajes celulares a partir de un precursor común, la célula madre hematopoyética. A diferencia de otros tejidos, la mayoría de las células hemáticas maduras tienen una corta vida media, lo que determina que el sistema hematopoyético tenga que estar reponiendo continuamente las células perdidas y adaptando su número a las necesidades del organismo en cada momento. Este proceso continuo de renovación hace que sea imprescindible la existencia de complejos sistemas de control que sean capaces, por una parte, de satisfacer las necesidades del organismo en cada momento y, por la otra, de controlar los riesgos derivados de una proliferación incontrolada. Aunque los mecanismos responsables del control de la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células hematopoyéticas no se conocen en su totalidad, los datos existentes en la actualidad sugieren la existencia de un complejo

sistema de control en el que participarían múltiples señales procedentes tanto de la propia médula ósea como de otros tejidos.

Dentro de los factores implicados en el control autocrino/paracrino de la hematopoyesis, una de las familias que está atrayendo un creciente interés es la del TGF- β ¹⁸³. En la actualidad, varios miembros de la familia del TGF- β entre los que se encuentran endoglina, BMPs, activinas y TGF- β 1 son capaces de regular la hematopoyesis, tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque la importancia real de muchos de ellos está todavía sin aclarar. Uno de los miembros de la familia más estudiado en la actualidad es el propio TGF- β . Los resultados obtenidos mediante estudios *in vitro* demuestran que el tratamiento con TGF- β es capaz de inhibir la proliferación de HSCs y de células progenitoras primitivas, tanto en humanos como en ratones¹¹⁸⁻¹²²; mientras que el bloqueo de la señalización autocrina del TGF- β 1 mejora la cinética y la supervivencia de las HSCs¹²⁵. Resultados similares han sido obtenidos *in vivo*, en los que se ha visto que la inyección de TGF- β 1 inhibe la proliferación de progenitores hematopoyéticos multipotenciales en la médula ósea de ratón¹²⁶. Por último, aunque durante mucho tiempo la implicación del TGF- β en el proceso de hematopoyesis fue difícil de concretar debido al carácter letal de las mutaciones que afectan a su función, más recientemente, la posibilidad de utilizar modelos *knockout* condicionales ha permitido comprobar la importancia de estos factores en dicho proceso y, más concretamente el papel clave desempeñado por diversas Smads¹⁸⁴.

Las activinas constituyen el segundo grupo de miembros de la familia del TGF- β con un posible papel relevante en la regulación de la hematopoyesis. Aunque las activinas fueron identificadas inicialmente por su capacidad de estimular la síntesis y secreción de hormona folículoestimulante en la hipófisis, hoy en día está claro que las activinas regulan múltiples funciones dentro de las que se incluye el control de la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares. Estas acciones son ejercidas sobre múltiples sistemas entre los que se incluyen no solo el sistema endocrino, sino también el sistema inmune, el sistema nervioso o el sistema hematopoyético. Dentro de la familia de las

activinas, la act-A es el miembro que desempeña un papel más relevante en el proceso de hematopoyesis. La act-A actúa ya en fases muy precoces del proceso de formación de células hemáticas ya que es uno de los factores que estimulan la diferenciación de precursores mesodérmicos a hemangioblastos¹⁴³⁻¹⁴⁵, el tipo celular que dará origen tanto a las células hemáticas como a la mayor parte del sistema cardiocirculatorio. En adultos, la act-A es expresada por células estromales localizadas en los nichos hematopoyéticos de la médula ósea¹⁴⁶. También se ha detectado la expresión de act-A en células hematopoyéticas, y aunque los niveles de expresión son bajos en las HSCs^{147,148} éstos aumentan a lo largo del proceso de hematopoyesis. La act-A es capaz de regular diferentes fases del proceso hematopoyético, con acciones hasta cierto punto contrapuestas en algunos casos, por lo que resulta difícil conocer el papel real de la hormona. Así, se ha visto que la act-A es capaz de inhibir la proliferación de HSCs de ratón y de regular negativamente la formación de linfocitos B. Por el contrario, la act-A ejerce, en la mayor parte de los casos, un efecto estimulador sobre células de estirpe mieloide. En este sentido, se ha descrito que la act-A es capaz de estimular la formación de CFU-E, BFU-E y CFU-GEMM, además de estimular la diferenciación de células eritroides^{146,149,185}. En el caso de las CFU-GM la act-A no parece tener ningún efecto sobre la formación^{149,150} e incluso existen estudios que sugieren que puede llegar a inhibirla^{151,152}. Por último, se ha sugerido también que la act-A puede inducir diferenciación megacariocítica¹⁵⁹⁻¹⁶¹ aunque los resultados en este caso no son tan claros.

Como ya señalamos anteriormente, la act-A comparte receptores con la MSTN, por lo que sería lógico pensar que ambas hormonas ejercen efectos similares sobre la hematopoyesis. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que, de forma similar a lo que ocurre con la act-A, la MSTN ejerce un efecto positivo sobre la formación de células hemáticas de estirpe mieloide, sin afectar a las células linfoides. En el caso concreto de las células HL-60, el efecto de la MSTN se centra en la diferenciación y supervivencia celular, sin afectar a la proliferación; mientras que en las células K562 la MSTN produjo también una marcada estimulación de la diferenciación celular que, a

diferencia de lo hallado en células HL60, se acompañó de una disminución del número de células.

El mecanismo mediante el cual la act-A regula la diferenciación eritroide ha sido estudiado con detalle en células K562. En el 2004 Huei-Mei y col.¹⁸⁶ proporcionan la primera evidencia de que act-A inhibe el crecimiento celular e induce síntesis de Hb por inhibición de la ruta de ERK y la activación de p38-MAPK. Esta ruta de señalización para la diferenciación mediada por act-A es consistente con otros estudios, en los cuales el butirato sódico o la hidroxiurea inducen la diferenciación eritroide implicando la inhibición de ERK y activación de p38-MAPK, aunque éstos también inhiben la fosforilación de JNK. Existen numerosos estudios que demuestran que ERK juega un papel importante en la proliferación celular^{187,188} en múltiples tipos celulares, entre los que se incluyen células de estirpe hematopoyética. Así, en leucemias agudas humanas ERK está constitutivamente activado y parece ser crítico para la proliferación frente a la diferenciación celular¹⁸⁹; mientras que la inhibición de ERK inhibe la proliferación¹⁹⁰ y estimula la diferenciación celular¹⁹¹. Adicionalmente, p38-MAPK está implicado en la diferenciación eritroide inducida por EPO de células eritroleucémicas^{192,193}, demostrando que la act-A y la EPO podrían estar compartiendo la misma ruta de señalización. La ruta de p38-MAPK también ha sido relacionada con la regulación de la inducción del gen γ -globina en progenitores eritroides^{194,195} así como la expresión y activación de los promotores de α -globina y ζ -globina¹⁹⁶. Además, recientemente se ha demostrado que act-A induce la ruta de p38-MAPK para inhibir el crecimiento celular en células de cáncer de mama humano¹⁹⁷. Lo que se sugiere, por lo tanto, que la vía de ERK puede participar en el crecimiento celular y en la inhibición de la diferenciación, mientras que la de p38-MAPK lo haría en la diferenciación celular y en la inhibición del crecimiento eritroide (figura 25).

De acuerdo con nuestros resultados, el efecto de la MSTN sobre la diferenciación de las células K562 podría producirse a través de un mecanismo similar, ya que el tratamiento con MSTN, que estimula la diferenciación y

disminuye la proliferación, produce un aumento de la fosforilación de p38-MAPK, sin modificar los niveles de fosforilación de ERK.

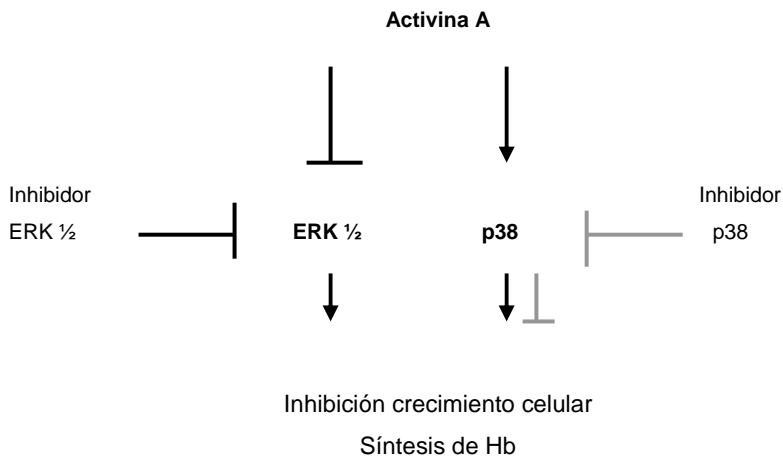


Figura 25- Modulación de Act-A en la regulación de la eritropoyesis. Act-A activa p38-MAPK e inhibe ERK para provocar inhibición de la proliferación celular y síntesis de Hb en K562. El inhibidor de p38-MAPK suprime, mientras que el de ERK induce la diferenciación mediada por act-A.

A diferencia de lo que ocurre en células K562, el papel de la act-A en células HL-60 no está tan claramente estudiado. Los datos existentes en la literatura indican que la act-A inhibe el crecimiento, favorece la supervivencia y estimula la diferenciación de células HL-60^{155,156}, pero no se conocen las vías de señalización activadas. Los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento con MSTN es capaz de estimular la fosforilación de p38-MPAK y ERK, lo que sugiere que ambas proteínas podrían ser las responsables de los efectos observados. Concretamente, la activación de p38-MAPK estaría implicada en la estimulación de la diferenciación de células HL-60, al igual que ocurre en células K562, mientras que la activación de la vía de ERK sería la responsable, en este caso, del incremento en el número de células.

Un aspecto importante, a la hora de plantearse las posibles acciones de la MSTN en la hematopoyesis es determinar cuál sería la procedencia de la

hormona. Como ya mencionamos anteriormente, el músculo esquelético es el tejido en el que se expresan mayores niveles de MSTN. Aunque la principal función de esta MSTN muscular es regular de forma autocrina/paracrina el desarrollo muscular, parte de la MSTN producida por el músculo es liberada a la circulación sanguínea. Sin embargo, en condiciones normales, la MSTN circulante tiene su actividad biológica limitada por la existencia de una serie de mecanismos que tienden a inactivarla^{62-65,72,73}. Por tanto, resulta difícil establecer si los niveles circulantes de MSTN son suficientes para regular el proceso hematopoyético, al menos en condiciones fisiológicas. Sin embargo, existen datos en la literatura que demuestran que los sistemas de inactivación de la MSTN circulante pueden ser insuficientes en situaciones en las que existe un aumento de la liberación de MSTN a la circulación. Esta circunstancia es habitual en procesos asociados con pérdida de masa muscular como ocurre en la caquexia o tras inmobilizaciones prolongadas^{65,80,91,198,199}. En estas circunstancias, el exceso de MSTN circulante sí podría ser capaz de escapar a los mecanismos habituales de control, siendo así capaz de alcanzar la médula ósea y actuar sobre las células hematopoyéticas.

Una segunda posibilidad, que no excluye a la anterior, sería la existencia de síntesis de MSTN en el tejido hematopoyético. Aunque no hemos estudiado la posible expresión de MSTN en médula ósea, el hecho de que algunas de las líneas celulares hematopoyéticas estudiadas no solo respondan a la MSTN, sino que también sean capaces de producirla, sugiere la participación de la hormona dentro de los mecanismos de control autocrino/paracrino de la hematopoyesis. En este sentido, la MSTN vendría a añadirse al resto de miembros de la familia del TGF- β que participan en el control de este proceso. El hecho de que, el bloqueo de la MSTN endógena por medio del tratamiento con el propéptido no produjera ningún efecto observable sobre estas células, sugiere que las vías de señalización activadas por MSTN son también estimuladas por otros mensajeros, por lo que, dado que MSTN comparte receptores con act-A, parece lógico pensar que ambos factores formarían parte de un sistema de control redundante. Sin embargo, es también importante señalar que, a diferencia de los datos obtenidos *in vitro*, la ausencia

de MSTN sí fue capaz de modificar algunos parámetros hematopoyéticos *in vivo*. Sorprendentemente, los ratones MSTN^{-/-} presentan un mayor número de leucocitos circulantes y una mayor respuesta a la administración de G-CSF que los ratones MSTN^{+/+}, mientras que tanto el número de reticulocitos circulantes como la respuesta de las unidades formadoras de colonias al tratamiento con EPO están incrementados en los ratones MSTN^{-/-}. En principio, estos resultados sugieren que no todas las acciones de la MSTN sobre la hematopoyesis pueden ser compensadas por otros factores en situaciones de deficiencia o ausencia de la hormona. Sin embargo, debemos tener también en cuenta que los cambios fenotípicos observados en ratones MSTN^{-/-}, pueden no ser debidos únicamente a la ausencia de esta proteína. En primer lugar, el aumento de masa muscular puede estar asociado a un aumento de la liberación de factores capaces de modificar la hematopoyesis^{200,201}. En segundo lugar, asociado al gran desarrollo muscular (y, en gran medida, consecuencia de éste), se produce un marcado déficit de desarrollo del tejido adiposo en los ratones MSTN^{-/-}, y, en consecuencia, una disminución de la liberación de los factores producidos por este tejido, algunos de los cuales ejercen importantes efectos en el proceso de hematopoyesis²⁰².

Por último, el hecho de que exista síntesis de MSTN en leucocitos nos permite plantear que, además de su posible papel en la regulación de la hematopoyesis, la MSTN puede ejercer también un papel en la pérdida de masa muscular que se produce como consecuencia de determinados procesos inflamatorios. La atrofia muscular es un proceso complejo caracterizado por una pérdida de masa muscular (local o generalizada) que se origina principalmente por un desequilibrio del balance fisiológico entre síntesis y degradación proteica. La atrofia muscular generalizada es un signo frecuente en múltiples patologías entre las que se encuentran el SIDA, algunos tipos de cáncer, enfermedad pulmonar obstructiva crónica e insuficiencia renal; mientras que situaciones de atrofia muscular localizada se pueden observar en pacientes inmovilizados o en algunos tipos de inflamación muscular^{36,90,203-205}. En los casos de pérdida de masa muscular asociada a procesos inflamatorios, tanto sistémicos como localizados en el tejido muscular, el principal mecanismo implicado es el

aumento de la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que afectan directamente la homeostasis muscular, alterando el balance proteico. Además, la presencia de estos factores produce una estimulación de la infiltración de macrófagos, linfocitos y neutrófilos en el tejido muscular, con el consiguiente aumento de la liberación de mediadores inflamatorios, a la que hay que unir el efecto destructivo de los neutrófilos activados sobre el tejido muscular²⁰⁶. Por tanto, el hecho de que hayamos sido capaces de demostrar la existencia de expresión de MSTN en leucocitos sugiere la posibilidad de que la MSTN liberada localmente por estas células sea uno de los factores implicados en la pérdida de masa muscular asociada a la infiltración inflamatoria del músculo. En este sentido, es importante señalar la existencia de numerosos estudios que demuestran la importancia de la MSTN en la aparición de atrofia muscular, tanto en condiciones experimentales²⁰⁷⁻²⁰⁹ como en determinadas patologías^{36,210-212}. Por tanto, aunque serían necesarios más estudios para conocer exactamente la importancia de la MSTN producida por los leucocitos en este proceso, este mecanismo de acción podría explicar la eficacia de algunos tratamientos en los que la inhibición de la MSTN reduce la pérdida de masa muscular. Un ejemplo típico sería el efecto del bloqueo de la MSTN en ratones *mdx*, un modelo de enfermedad de Duchenne²¹³⁻²¹⁵. Aunque este tipo de patologías no suele asociarse con cambios en la expresión de MSTN^{216,217}, su bloqueo se asocia con un efecto positivo sobre la evolución de la enfermedad^{94,95}. Aunque clásicamente este efecto se ha atribuido a que el bloqueo de la MSTN aumenta la capacidad de regeneración del músculo, la posibilidad de que se esté impidiendo el efecto de la MSTN liberada por las células inflamatorias que infiltran los músculos afectados podría ser una posibilidad a tener en cuenta.

6. CONCLUSIONES

1. La MSTN es uno de los factores implicados en el control de la hematopoyesis, regulando la diferenciación y supervivencia de células de estirpe mieloide, pero sin actuar sobre células linfoides. Estas acciones serían ejercidas, al menos en parte, a través de un mecanismo autocrino/paracrino que implica la activación del complejo ActRIIB/ALK4 y la regulación de ERK y p38-MAPK.

2. La ausencia de MSTN no produce cambios marcados sobre la hematopoyesis *in vivo*, probablemente debido a la existencia de otros factores que compensan su ausencia y a los cambios fenotípicos que produce la ausencia de MSTN y que, secundariamente, son capaces de modificar la hematopoyesis.

3. La existencia de síntesis de MSTN en leucocitos sugiere su participación en la pérdida de masa muscular asociada a procesos inflamatorios del músculo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Hogan,B.L., Blessing,M., Winnier,G.E., Suzuki,N., & Jones,C.M. Growth factors in development: the role of TGF-beta related polypeptide signalling molecules in embryogenesis. *Dev. Suppl* 53-60 (1994).
2. Korc,M., Haussler,C.A., & Trooman,N.S. Divergent effects of epidermal growth factor and transforming growth factors on a human endometrial carcinoma cell line. *Cancer Res.* **47**, 4909-4914 (1987).
3. Ranges,G.E., Figari,I.S., Espevik,T., & Palladino,M.A., Jr. Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **166**, 991-998 (1987).
4. Ling,N., Ying,S.Y., Ueno,N., Shimasaki,S., Esch,F., Hotta,M., & Guillemin,R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* **321**, 779-782 (1986).
5. Wozney,J.M., Rosen,V., Celeste,A.J., Mitscock,L.M., Whitters,M.J., Kriz,R.W., Hewick,R.M., & Wang,E.A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**, 1528-1534 (1988).
6. Derynck, R & Miyazono K. The TGF-beta family. Cold Spring Harbor Monograph Series , 29-44 (2008).
7. Munger,J.S., Harpel,J.G., Gleizes,P.E., Mazzieri,R., Nunes,I., & Rifkin,D.B. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* **51**, 1376-1382 (1997).
8. de Winter,J.P., ten Dijke,P., de Vries,C.J., van Achterberg,T.A., Sugino,H., de Waele,P., Huylebroeck,D., Verschueren,K., & van den Eijnden-van Raaij AJ Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol. Cell Endocrinol.* **116**, 105-114 (1996).
9. Fainsod,A., Deissler,K., Yelin,R., Marom,K., Epstein,M., Pillemer,G., Steinbeisser,H., & Blum,M. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech. Dev.* **63**, 39-50 (1997).
10. Massague,J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753-791 (1998).
11. Massague,J. & Chen,Y.G. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* **14**, 627-644 (2000).
12. Massague,J. & Wotton,D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* **19**, 1745-1754 (2000).

13. Piek,E., Heldin,C.H., & ten Dijke,P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* **13**, 2105-2124 (1999).
14. Attisano,L., Carcamo,J., Ventura,F., Weis,F.M., Massague,J., & Wrana,J.L. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* **75**, 671-680 (1993).
15. Franzen,P., ten Dijke,P., Ichijo,H., Yamashita,H., Schulz,P., Heldin,C.H., & Miyazono,K. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* **75**, 681-692 (1993).
16. Liu,F., Ventura,F., Doody,J., & Massague,J. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3479-3486 (1995).
17. Rosenzweig,B.L., Imamura,T., Okadome,T., Cox,G.N., Yamashita,H., ten Dijke,P., Heldin,C.H., & Miyazono,K. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7632-7636 (1995).
18. Lopez-Casillas,F., Wrana,J.L., & Massague,J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* **73**, 1435-1444 (1993).
19. Barbara,N.P., Wrana,J.L., & Letarte,M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Biol. Chem.* **274**, 584-594 (1999).
20. Onichtchouk,D., Chen,Y.G., Dosch,R., Gawantka,V., Delius,H., Massague,J., & Niehrs,C. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**, 480-485 (1999).
21. Attisano,L. & Wrana,J.L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* **296**, 1646-1647 (2002).
22. Massague,J., Seoane,J., & Wotton,D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* **19**, 2783-2810 (2005).
23. Nishimura,T., Oyama,K., Kishioka,Y., Wakamatsu,J., & Hattori,A. Spatiotemporal expression of decorin and myostatin during rat skeletal muscle development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 896-902 (2007).
24. Tsukazaki,T., Chiang,T.A., Davison,A.F., Attisano,L., & Wrana,J.L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* **95**, 779-791 (1998).

25. Zhu,H., Kavsak,P., Abdollah,S., Wrana,J.L., & Thomsen,G.H. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**, 687-693 (1999).
26. Hata,A., Lagna,G., Massague,J., & Hemmati-Brivanlou,A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* **12**, 186-197 (1998).
27. Ishisaki,A., Yamato,K., Hashimoto,S., Nakao,A., Tamaki,K., Nonaka,K., ten Dijke,P., Sugino,H., & Nishihara,T. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 13637-13642 (1999).
28. Chen,X., Rubock,M.J., & Whitman,M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* **383**, 691-696 (1996).
29. McPherron,A.C., Lawler,A.M., & Lee,S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90 (1997).
30. Kambadur,R., Sharma,M., Smith,T.P., & Bass,J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* **7**, 910-916 (1997).
31. Grobet,L., Martin,L.J., Poncelet,D., Pirottin,D., Brouwers,B., Riquet,J., Schoeberlein,A., Dunner,S., Menissier,F., Massabanda,J., Fries,R., Hanset,R., & Georges,M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* **17**, 71-74 (1997).
32. Grobet,L., Poncelet,D., Royo,L.J., Brouwers,B., Pirottin,D., Michaux,C., Menissier,F., Zanotti,M., Dunner,S., & Georges,M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome* **9**, 210-213 (1998).
33. McPherron,A.C. & Lee,S.J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest* **109**, 595-601 (2002).
34. Clop,A., Marcq,F., Takeda,H., Pirottin,D., Tordoir,X., Bibe,B., Bouix,J., Caiment,F., Elsen,J.M., Eychenne,F., Larzul,C., Laville,E., Meish,F., Milenkovic,D., Tobin,J., Charlier,C., & Georges,M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* **38**, 813-818 (2006).
35. 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.* **3**, e79 (2007).
36. 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* **95**, 14938-14943 (1998).
 37. Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J., & Bass, J.J. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell Physiol* **180**, 1-9 (1999).
 38. Sundaresan, N.R., Saxena, V.K., Singh, R., Jain, P., Singh, K.P., Anish, D., Singh, N., Saxena, M., & Ahmed, K.A. Expression profile of myostatin mRNA during the embryonic organogenesis of domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Res. Vet. Sci.* **85**, 86-91 (2008).
 39. McKoy, G., Bicknell, K.A., Patel, K., & Brooks, G. Developmental expression of myostatin in cardiomyocytes and its effect on foetal and neonatal rat cardiomyocyte proliferation. *Cardiovasc. Res.* **74**, 304-312 (2007).
 40. Helderline, D.L., Garikipati, D., Stenkamp, D.L., & Rodgers, B.D. Embryonic and tissue-specific regulation of myostatin-1 and -2 gene expression in zebrafish. *Gen. Comp Endocrinol.* **151**, 90-97 (2007).
 41. Garikipati, D.K., Gahr, S.A., & Rodgers, B.D. Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. *J. Endocrinol.* **190**, 879-888 (2006).
 42. Garikipati, D.K., Gahr, S.A., Roalson, E.H., & Rodgers, B.D. Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMSTN-2a and -2b): genomic organization, differential expression, and pseudogenization. *Endocrinology* **148**, 2106-2115 (2007).
 43. Rescan, P.Y., Jutel, I., & Ralliere, C. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* **204**, 3523-3529 (2001).
 44. Casas, E., Stone, R.T., Keele, J.W., Shackelford, S.D., Kappes, S.M., & Koohmaraie, M. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. *J. Anim Sci.* **79**, 854-860 (2001).

45. Casas,E., Bennett,G.L., Smith,T.P., & Cundiff,L.V. Association of myostatin on early calf mortality, growth, and carcass composition traits in crossbred cattle. *J. Anim Sci.* **82**, 2913-2918 (2004).
46. Ji,S., Losinski,R.L., Cornelius,S.G., Frank,G.R., Willis,G.M., Gerrard,D.E., Depreux,F.F., & Spurlock,M.E. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol* **275**, R1265-R1273 (1998).
47. Cho,T.J., Gerstenfeld,L.C., & Einhorn,T.A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 513-520 (2002).
48. Ng,L., Pathak,S.D., Kuan,C., Lau,C., Dong,H., Sodt,A., Dang,C., Avants,B., Yushkevich,P., Gee,J.C., Haynor,D., Lein,E., Jones,A., & Hawrylycz,M. Neuroinformatics for genome-wide 3D gene expression mapping in the mouse brain. *IEEE/ACM. Trans. Comput. Biol. Bioinform.* **4**, 382-393 (2007).
49. Lein,E.S., Hawrylycz,M.J., Ao,N., Ayres,M., Bensinger,A., Bernard,A., Boe,A.F., Boguski,M.S., Brockway,K.S., Byrnes,E.J., Chen,L., Chen,L., Chen,T.M., Chin,M.C., Chong,J., Crook,B.E., Czaplinska,A., Dang,C.N., Datta,S., Dee,N.R., Desaki,A.L., Desta,T., Diep,E., Dolbeare,T.A., Donelan,M.J., Dong,H.W., Dougherty,J.G., Duncan,B.J., Ebbert,A.J., Eichele,G., Estin,L.K., Faber,C., Facer,B.A., Fields,R., Fischer,S.R., Fliss,T.P., Frensley,C., Gates,S.N., Glattfelder,K.J., Halverson,K.R., Hart,M.R., Hohmann,J.G., Howell,M.P., Jeung,D.P., Johnson,R.A., Karr,P.T., Kaval,R., Kidney,J.M., Knapik,R.H., Kuan,C.L., Lake,J.H., Laramée,A.R., Larsen,K.D., Lau,C., Lemon,T.A., Liang,A.J., Liu,Y., Luong,L.T., Michaels,J., Morgan,J.J., Morgan,R.J., Mortrud,M.T., Mosqueda,N.F., Ng,L.L., Ng,R., Orta,G.J., Overly,C.C., Pak,T.H., Parry,S.E., Pathak,S.D., Pearson,O.C., Puchalski,R.B., Riley,Z.L., Rockett,H.R., Rowland,S.A., Royall,J.J., Ruiz,M.J., Sarno,N.R., Schaffnit,K., Shapovalova,N.V., Sivisay,T., Slaughterbeck,C.R., Smith,S.C., Smith,K.A., Smith,B.I., Sodt,A.J., Stewart,N.N., Stumpf,K.R., Sunkin,S.M., Sutram,M., Tam,A., Teemer,C.D., Thaller,C., Thompson,C.L., Varnam,L.R., Visel,A., Whitlock,R.M., Wohnoutka,P.E., Wolkey,C.K., Wong,V.Y., Wood,M., Yaylaoglu,M.B., Young,R.C., Youngstrom,B.L., Yuan,X.F., Zhang,B., Zwingman,T.A., & Jones,A.R. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168-176 (2007).
50. Kubota,K., Sato,F., Aramaki,S., Soh,T., Yamauchi,N., & Hattori,M.A. Ubiquitous expression of myostatin in chicken embryonic tissues: its high expression in testis and ovary. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* **148**, 550-555 (2007).

51. Ciarmela,P., Wiater,E., Smith,S.M., & Vale,W. Presence, actions, and regulation of myostatin in rat uterus and myometrial cells. *Endocrinology* **150**, 906-914 (2009).
52. Wong,C.L., Huang,Y.Y., Ho,W.K., Poon,H.K., Cheung,P.L., WS,O., & Chow,P.H. Growth-differentiation factor-8 (GDF-8) in the uterus: its identification and functional significance in the golden hamster. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **7**, 134 (2009).
53. Daopin,S., Piez,K.A., Ogawa,Y., & Davies,D.R. Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* **257**, 369-373 (1992).
54. Schlunegger,M.P. & Grutter,M.G. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature* **358**, 430-434 (1992).
55. Griffith,D.L., Keck,P.C., Sampath,T.K., Rueger,D.C., & Carlson,W.D. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 878-883 (1996).
56. Hinck,A.P., Archer,S.J., Qian,S.W., Roberts,A.B., Sporn,M.B., Weatherbee,J.A., Tsang,M.L., Lucas,R., Zhang,B.L., Wenker,J., & Torchia,D.A. Transforming growth factor beta 1: three-dimensional structure in solution and comparison with the X-ray structure of transforming growth factor beta 2. *Biochemistry* **35**, 8517-8534 (1996).
57. Mittl,P.R., Priestle,J.P., Cox,D.A., McMaster,G., Cerletti,N., & Grutter,M.G. The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding. *Protein Sci.* **5**, 1261-1271 (1996).
58. Eigenbrot,C. & Gerber,N. X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 435-438 (1997).
59. Scheufler,C., Sebald,W., & Hulsmeyer,M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **287**, 103-115 (1999).
60. Kirsch,T., Sebald,W., & Dreyer,M.K. Crystal structure of the BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 492-496 (2000).
61. Thompson,T.B., Woodruff,T.K., & Jardetzky,T.S. Structures of an ActRIIB:activin A complex reveal a novel binding mode for TGF-beta ligand:receptor interactions. *EMBO J.* **22**, 1555-1566 (2003).

62. Lee, S.J. & McPherron, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 9306-9311 (2001).
63. Thies, R.S., Chen, T., Davies, M.V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A., & Wolfman, N.M. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* **18**, 251-259 (2001).
64. Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S., & Lee, S.J. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 15842-15846 (2003).
65. Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M., & Lee, S.J. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* **296**, 1486-1488 (2002).
66. Yang, J., Ratovitski, T., Brady, J.P., Solomon, M.B., Wells, K.D., & Wall, R.J. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* **60**, 351-361 (2001).
67. Miyazono, K., Hellman, U., Wernstedt, C., & Heldin, C.H. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J. Biol. Chem.* **263**, 6407-6415 (1988).
68. Lee, S.J. Genetic analysis of the role of proteolysis in the activation of latent myostatin. *PLoS. One.* **3**, e1628 (2008).
69. Amthor, H., Connolly, D., Patel, K., Brand-Saberi, B., Wilkinson, D.G., Cooke, J., & Christ, B. The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis. *Dev. Biol.* **178**, 343-362 (1996).
70. Amthor, H., Huang, R., McKinnell, I., Christ, B., Kambadur, R., Sharma, M., & Patel, K. The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Dev. Biol.* **251**, 241-257 (2002).
71. 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* **374**, 360-363 (1995).
72. Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., & Qiu, Y. The myostatin propeptide and the follistatin-

- related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Biol. Chem.* **277**, 40735-40741 (2002).
73. Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M., & Wolfman, N.M. 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.* **17**, 1144-1154 (2003).
74. Hayette, S., Gadoux, M., Martel, S., Bertrand, S., Tigaud, I., Magaud, J.P., & Rimokh, R. FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders. *Oncogene* **16**, 2949-2954 (1998).
75. Tsuchida, K., Arai, K.Y., Kuramoto, Y., Yamakawa, N., Hasegawa, Y., & Sugino, H. Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family. *J. Biol. Chem.* **275**, 40788-40796 (2000).
76. Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J.L., Celeste, A.J., & Attisano, L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7230-7242 (2003).
77. Attisano, L., Wrana, J.L., Cheifetz, S., & Massague, J. Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* **68**, 97-108 (1992).
78. Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M., Tidball, J.G., & McNally, E.M. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett.* **474**, 71-75 (2000).
79. Bogdanovich, S., Krag, T.O., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittemore, L.A., Ahima, R.S., & Khurana, T.S. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* **420**, 418-421 (2002).
80. Whittemore, L.A., Song, K., Li, X., Aghajanian, J., Davies, M., Girgenrath, S., Hill, J.J., Jalenak, M., Kelley, P., Knight, A., Maylor, R., O'Hara, D., Pearson, A., Quazi, A., Ryerson, S., Tan, X.Y., Tomkinson, K.N., Veldman, G.M., Widom, A., Wright, J.F., Wudyka, S., Zhao, L., & Wolfman, N.M. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 965-971 (2003).
81. Nishi, M., Yasue, A., Nishimatu, S., Nohno, T., Yamaoka, T., Itakura, M., Moriyama, K., Ohuchi, H., & Noji, S. A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 247-251 (2002).

82. 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.* **275**, 40235-40243 (2000).
83. Rios,R., Carneiro,I., Arce,V.M., & Devesa,J. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 561-566 (2001).
84. Joulia,D., Bernardi,H., Garandel,V., Rabenoelina,F., Vernus,B., & Cabello,G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res.* **286**, 263-275 (2003).
85. Langley,B., Thomas,M., Bishop,A., Sharma,M., Gilmour,S., & Kambadur,R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 49831-49840 (2002).
86. Rios,R., Carneiro,I., Arce,V.M., & Devesa,J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **282**, C993-C999 (2002).
87. McCroskery,S., Thomas,M., Maxwell,L., Sharma,M., & Kambadur,R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell Biol.* **162**, 1135-1147 (2003).
88. Taylor,W.E., Bhasin,S., Artaza,J., Byhower,F., Azam,M., Willard,D.H., Jr., Kull,F.C., Jr., & Gonzalez-Cadavid,N. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **280**, E221-E228 (2001).
89. Kim,H.S., Liang,L., Dean,R.G., Hausman,D.B., Hartzell,D.L., & Baile,C.A. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 902-906 (2001).
90. Reardon,K.A., Davis,J., Kapsa,R.M., Choong,P., & Byrne,E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* **24**, 893-899 (2001).
91. Zachwieja,J.J., Smith,S.R., Sinha-Hikim,I., Gonzalez-Cadavid,N., & Bhasin,S. Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *J. Gravit. Physiol* **6**, 11-15 (1999).
92. Lin,J., Arnold,H.B., Della-Fera,M.A., Azain,M.J., Hartzell,D.L., & Baile,C.A. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and

- decreases adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 701-706 (2002).
93. Hepple, R.T. Sarcopenia--a critical perspective. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2003**, e31 (2003).
94. Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N., & Lee, S.J. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann. Neurol.* **52**, 832-836 (2002).
95. Wagner, K.R., Liu, X., Chang, X., & Allen, R.E. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 2519-2524 (2005).
96. Li, Z.F., Shelton, G.D., & Engvall, E. Elimination of myostatin does not combat muscular dystrophy in dy mice but increases postnatal lethality. *Am. J. Pathol.* **166**, 491-497 (2005).
97. Porcher, C., Swat, W., Rockwell, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., & Orkin, S.H. The T cell leukemia oncogene SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* **86**, 47-57 (1996).
98. Robb, L., Elwood, N.J., Elefanty, A.G., Kontgen, F., Li, R., Barnett, L.D., & Begley, C.G. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* **15**, 4123-4129 (1996).
99. Yamada, Y., Warren, A.J., Dobson, C., Forster, A., Pannell, R., & Rabbitts, T.H. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 3890-3895 (1998).
100. Hall, M.A., Curtis, D.J., Metcalf, D., Elefanty, A.G., Sourris, K., Robb, L., Gothert, J.R., Jane, S.M., & Begley, C.G. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 992-997 (2003).
101. Ichikawa, M., Asai, T., Saito, T., Seo, S., Yamazaki, I., Yamagata, T., Mitani, K., Chiba, S., Ogawa, S., Kurokawa, M., & Hirai, H. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat. Med.* **10**, 299-304 (2004).
102. Gainsford, T., Roberts, A.W., Kimura, S., Metcalf, D., Dranoff, G., Mulligan, R.C., Begley, C.G., Robb, L., & Alexander, W.S. Cytokine production and function in c-mpl-deficient mice: no physiologic role for

- interleukin-3 in residual megakaryocyte and platelet production. *Blood* **91**, 2745-2752 (1998).
103. Evans,C.A., Pierce,A., Winter,S.A., Spooncer,E., Heyworth,C.M., & Whetton,A.D. Activation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 receptor subunits in a multipotential hematopoietic progenitor cell line leads to differential effects on development. *Blood* **94**, 1504-1514 (1999).
 104. Fukunaga,R., Ishizaka-Ikeda,E., & Nagata,S. Growth and differentiation signals mediated by different regions in the cytoplasmic domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Cell* **74**, 1079-1087 (1993).
 105. Porteu,F., Rouyez,M.C., Cocault,L., Benit,L., Charon,M., Picard,F., Gisselbrecht,S., Souyri,M., & Dusanter-Fourt,I. Functional regions of the mouse thrombopoietin receptor cytoplasmic domain: evidence for a critical region which is involved in differentiation and can be complemented by erythropoietin. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2473-2482 (1996).
 106. Kondo,M., Scherer,D.C., Miyamoto,T., King,A.G., Akashi,K., Sugamura,K., & Weissman,I.L. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature* **407**, 383-386 (2000).
 107. Iwasaki-Arai,J., Iwasaki,H., Miyamoto,T., Watanabe,S., & Akashi,K. Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. *J. Exp. Med.* **197**, 1311-1322 (2003).
 108. McArthur,G.A., Rohrschneider,L.R., & Johnson,G.R. Induced expression of c-fms in normal hematopoietic cells shows evidence for both conservation and lineage restriction of signal transduction in response to macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **83**, 972-981 (1994).
 109. Socolovsky,M., Dusanter-Fourt,I., & Lodish,H.F. The prolactin receptor and severely truncated erythropoietin receptors support differentiation of erythroid progenitors. *J. Biol. Chem.* **272**, 14009-14012 (1997).
 110. Goldsmith,M.A., Mikami,A., You,Y., Liu,K.D., Thomas,L., Pharr,P., & Longmore,G.D. Absence of cytokine receptor-dependent specificity in red blood cell differentiation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 7006-7011 (1998).
 111. Fairbairn,L.J., Cowling,G.J., Reipert,B.M., & Dexter,T.M. Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell* **74**, 823-832 (1993).

112. Akashi,K., Kondo,M., Freedden-Jeffry,U., Murray,R., & Weissman,I.L. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* **89**, 1033-1041 (1997).
113. Lagasse,E. & Weissman,I.L. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* **89**, 1021-1031 (1997).
114. Maraskovsky,E., O'Reilly,L.A., Teepe,M., Corcoran,L.M., Peschon,J.J., & Strasser,A. Bcl-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1-/- mice. *Cell* **89**, 1011-1019 (1997).
115. Dybedal,I., Guan,F., Borge,O.J., Veiby,O.P., Ramsfjell,V., Nagata,S., & Jacobsen,S.E. Transforming growth factor-beta1 abrogates Fas-induced growth suppression and apoptosis of murine bone marrow progenitor cells. *Blood* **90**, 3395-3403 (1997).
116. Krystal,G., Lam,V., Dragowska,W., Takahashi,C., Appel,J., Gontier,A., Jenkins,A., Lam,H., Quon,L., & Lansdorp,P. Transforming growth factor beta 1 is an inducer of erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* **180**, 851-860 (1994).
117. Pierelli,L., Marone,M., Bonanno,G., Mozzetti,S., Rutella,S., Morosetti,R., Rumi,C., Mancuso,S., Leone,G., & Scambia,G. Modulation of bcl-2 and p27 in human primitive proliferating hematopoietic progenitors by autocrine TGF-beta1 is a cell cycle-independent effect and influences their hematopoietic potential. *Blood* **95**, 3001-3009 (2000).
118. Lu,L., Xiao,M., Grigsby,S., Wang,W.X., Wu,B., Shen,R.N., & Broxmeyer,H.E. Comparative effects of suppressive cytokines on isolated single CD34(3+) stem/progenitor cells from human bone marrow and umbilical cord blood plated with and without serum. *Exp. Hematol.* **21**, 1442-1446 (1993).
119. Batard,P., Monier,M.N., Fortunel,N., Ducos,K., Sansilvestri-Morel,P., Phan,T., Hatzfeld,A., & Hatzfeld,J.A. TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 3)**, 383-390 (2000).
120. Sitnicka,E., Ruscetti,F.W., Priestley,G.V., Wolf,N.S., & Bartelmez,S.H. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* **88**, 82-88 (1996).
121. Keller,J.R., Mcniece,I.K., Sill,K.T., Ellingsworth,L.R., Quesenberry,P.J., Sing,G.K., & Ruscetti,F.W. Transforming growth factor beta directly

- regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation. *Blood* **75**, 596-602 (1990).
122. Jacobsen,S.E., Keller,J.R., Ruscetti,F.W., Kondaiiah,P., Roberts,A.B., & Falk,L.A. Bidirectional effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on colony-stimulating factor-induced human myelopoiesis in vitro: differential effects of distinct TGF-beta isoforms. *Blood* **78**, 2239-2247 (1991).
 123. Ploemacher,R.E., van Soest,P.L., & Boudewijn,A. Autocrine transforming growth factor beta 1 blocks colony formation and progenitor cell generation by hemopoietic stem cells stimulated with steel factor. *Stem Cells* **11**, 336-347 (1993).
 124. Li,M.L., Cardoso,A.A., Sansilvestri,P., Hatzfeld,A., Brown,E.L., Sookdeo,H., Levesque,J.P., Clark,S.C., & Hatzfeld,J. Additive effects of steel factor and antisense TGF-beta 1 oligodeoxynucleotide on CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* **8**, 441-445 (1994).
 125. Fan,X., Valdimarsdottir,G., Larsson,J., Brun,A., Magnusson,M., Jacobsen,S.E., ten Dijke,P., & Karlsson,S. Transient disruption of autocrine TGF-beta signaling leads to enhanced survival and proliferation potential in single primitive human hemopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* **168**, 755-762 (2002).
 126. Goey,H., Keller,J.R., Back,T., Longo,D.L., Ruscetti,F.W., & Wiltrot,R.H. Inhibition of early murine hemopoietic progenitor cell proliferation after in vivo locoregional administration of transforming growth factor-beta 1. *J. Immunol.* **143**, 877-880 (1989).
 127. Ruscetti,F.W., Akel,S., & Bartelmez,S.H. Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene* **24**, 5751-5763 (2005).
 128. Kim,S.J. & Letterio,J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* **17**, 1731-1737 (2003).
 129. Jacobsen,S.E., Keller,J.R., Ruscetti,F.W., Kondaiiah,P., Roberts,A.B., & Falk,L.A. Bidirectional effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on colony-stimulating factor-induced human myelopoiesis in vitro: differential effects of distinct TGF-beta isoforms. *Blood* **78**, 2239-2247 (1991).
 130. Keller,J.R., Mcniece,I.K., Sill,K.T., Ellingsworth,L.R., Quesenberry,P.J., Sing,G.K., & Ruscetti,F.W. Transforming growth factor beta directly regulates primitive murine hematopoietic cell proliferation. *Blood* **75**, 596-602 (1990).

131. Langer, J.C., Henckaerts, E., Orenstein, J., & Snoeck, H.W. Quantitative trait analysis reveals transforming growth factor-beta2 as a positive regulator of early hematopoietic progenitor and stem cell function. *J. Exp. Med.* **199**, 5-14 (2004).
132. Sadlon, T.J., Lewis, I.D., & D'Andrea, R.J. BMP4: its role in development of the hematopoietic system and potential as a hematopoietic growth factor. *Stem Cells* **22**, 457-474 (2004).
133. Snyder, A., Fraser, S.T., & Baron, M.H. Bone morphogenetic proteins in vertebrate hematopoietic development. *J. Cell Biochem.* **93**, 224-232 (2004).
134. Gupta, S., Zhu, H., Zon, L.I., & Evans, T. BMP signaling restricts hemato-vascular development from lateral mesoderm during somitogenesis. *Development* **133**, 2177-2187 (2006).
135. Maeno, M., Mead, P.E., Kelley, C., Xu, R.H., Kung, H.F., Suzuki, A., Ueno, N., & Zon, L.I. The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic mesoderm in *Xenopus laevis*. *Blood* **88**, 1965-1972 (1996).
136. Huber, T.L., Zhou, Y., Mead, P.E., & Zon, L.I. Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood* **92**, 4128-4137 (1998).
137. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., & Hogan, B.L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* **9**, 2105-2116 (1995).
138. Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N., & Behringer, R.R. Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* **9**, 3027-3037 (1995).
139. Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., & Bhatia, M. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* **102**, 906-915 (2003).
140. Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L., & Dick, J.E. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **189**, 1139-1148 (1999).
141. Maguer-Satta, V. & Rimokh, R. FLRG, member of the follistatin family, a new player in hematopoiesis. *Mol. Cell Endocrinol.* **225**, 109-118 (2004).
142. Fuchs, O., Simakova, O., Klener, P., Cmejlova, J., Zivny, J., Zavadil, J., & Stopka, T. Inhibition of Smad5 in human hematopoietic progenitors

- blocks erythroid differentiation induced by BMP4. *Blood Cells Mol. Dis.* **28**, 221-233 (2002).
143. Johansson,B.M. & Wiles,M.V. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol. Cell Biol.* **15**, 141-151 (1995).
144. Park,C., Afrikanova,I., Chung,Y.S., Zhang,W.J., Arentson,E., Fong,G.G., Rosendahl,A., & Choi,K. A hierarchical order of factors in the generation of. *Development* **131**, 2749-2762 (2004).
145. Pearson,S., Sroczynska,P., Lacaud,G., & Kouskoff,V. The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development* **135**, 1525-1535 (2008).
146. Shav-Tal,Y. & Zipori,D. The role of activin a in regulation of hemopoiesis. *Stem Cells* **20**, 493-500 (2002).
147. Maguer-Satta,V., Bartholin,L., Jeanpierre,S., Gadoux,M., Bertrand,S., Martel,S., Magaud,J.P., & Rimokh,R. Expression of FLRG, a novel activin A ligand, is regulated by TGF-beta and during hematopoiesis [corrected]. *Exp. Hematol.* **29**, 301-308 (2001).
148. Utsugisawa,T., Moody,J.L., Aspling,M., Nilsson,E., Carlsson,L., & Karlsson,S. A road map toward defining the role of Smad signaling in hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **24**, 1128-1136 (2006).
149. Broxmeyer,H.E., Lu,L., Cooper,S., Schwall,R.H., Mason,A.J., & Nikolics,K. Selective and indirect modulation of human multipotential and erythroid hematopoietic progenitor cell proliferation by recombinant human activin and inhibin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 9052-9056 (1988).
150. Yu,J., Shao,L., Vaughan,J., Vale,W., & Yu,A.L. Characterization of the potentiation effect of activin on human erythroid colony formation in vitro. *Blood* **73**, 952-960 (1989).
151. Mizuguchi,T., Kosaka,M., & Saito,S. Activin A suppresses proliferation of interleukin-3-responsive granulocyte-macrophage colony-forming progenitors and stimulates proliferation and differentiation of interleukin-3-responsive erythroid burst-forming progenitors in the peripheral blood. *Blood* **81**, 2891-2897 (1993).
152. Nakamura,K., Kosaka,M., Mizuguchi,T., & Saito,S. Effect of erythroid differentiation factor on maintenance of human hematopoietic cells in co-cultures with allogenic stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1103-1110 (1993).

153. Shao,L., Frigon,N.L., Jr., Sehy,D.W., Yu,A.L., Lofgren,J., Schwall,R., & Yu,J. Regulation of production of activin A in human marrow stromal cells and monocytes. *Exp. Hematol.* **20**, 1235-1242 (1992).
154. Fukuchi,Y., Kizaki,M., Yamato,K., Kawamura,C., Umezawa,A., Hata,J., Nishihara,T., & Ikeda,Y. Mcl-1, an early-induction molecule, modulates activin A-induced apoptosis and differentiation of CML cells. *Oncogene* **20**, 704-713 (2001).
155. Okabe-Kado,J., Honma,Y., Hayashi,M., & Hozumi,M. Effects of transforming growth factor-beta and activin A on vitamin D3-induced monocytic differentiation of myeloid leukemia cells. *Anticancer Res.* **11**, 181-186 (1991).
156. Yamada,R., Suzuki,T., Hashimoto,M., Eto,Y., Shiokawa,K., & Muramatsu,M. Induction of differentiation of the human promyelocytic cell line HL-60 by activin/EDF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 79-85 (1992).
157. Nishihara,T., Okahashi,N., & Ueda,N. Activin A induces apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 985-991 (1993).
158. Petraglia,F., Sacerdote,P., Cossarizza,A., Angioni,S., Genazzani,A.D., Franceschi,C., Muscettola,M., & Grasso,G. Inhibin and activin modulate human monocyte chemotaxis and human lymphocyte interferon-gamma production. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **72**, 496-502 (1991).
159. Fujimoto,K., Kawakita,M., Kato,K., Yonemura,Y., Masuda,T., Matsuzaki,H., Hirose,J., Isaji,M., Sasaki,H., Inoue,T., & . Purification of megakaryocyte differentiation activity from a human fibrous histiocytoma cell line: N-terminal sequence homology with activin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 1163-1168 (1991).
160. Nishimura,M., Kaku,K., Azuno,Y., Okafuji,K., Etoh,Y., Shiozaki,M., Sasaki,H., Inoue,T., & Kaneko,T. Effect of erythroid differentiation factor on megakaryocytic differentiation of L8057, a murine megakaryoblastic leukemia cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1042-1047 (1991).
161. Okafuji,K., Kaku,K., Seguchi,M., Tanaka,H., Azuno,Y., & Kaneko,T. Effects of activin A/erythroid differentiation factor on erythroid and megakaryocytic differentiations of mouse erythroleukemia (Friend) cells: evidence for two distinct modes of cell response. *Exp. Hematol.* **23**, 210-216 (1995).
162. Schwall,R., Schmelzer,C.H., Matsuyama,E., & Mason,A.J. Multiple actions of recombinant activin-A in vivo. *Endocrinology* **125**, 1420-1423 (1989).

163. Broxmeyer,H.E., Hangoc,G., Zucali,J.R., Mason,A., Schwall,R., Carow,C., & Cooper,S. Effects in vivo of purified recombinant human activin and erythropoietin in mice. *Int. J. Hematol.* **54**, 447-454 (1991).
164. Yu,J., Shao,L.E., Lemas,V., Yu,A.L., Vaughan,J., Rivier,J., & Vale,W. Importance of FSH-releasing protein and inhibin in erythrodifferentiation. *Nature* **330**, 765-767 (1987).
165. Frigon,N.L., Jr., Shao,L., Young,A.L., Maderazo,L., & Yu,J. Regulation of globin gene expression in human K562 cells by recombinant activin A. *Blood* **79**, 765-772 (1992).
166. Hashimoto,O., Yamato,K., Koseki,T., Ohguchi,M., Ishisaki,A., Shoji,H., Nakamura,T., Hayashi,Y., Sugino,H., & Nishihara,T. The role of activin type I receptors in activin A-induced growth arrest and apoptosis in mouse B-cell hybridoma cells. *Cell Signal.* **10**, 743-749 (1998).
167. Yamato,K., Koseki,T., Ohguchi,M., Kizaki,M., Ikeda,Y., & Nishihara,T. Activin A induction of cell-cycle arrest involves modulation of cyclin D2 and p21CIP1/WAF1 in plasmacytic cells. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1044-1052 (1997).
168. Honigwachs-Sha'anani,J., Brosh,N., Kompier,R., Kadouri,A., & Zipori,D. Restrictin-P: the first member of a putative family of novel inhibitors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **628**, 287-297 (1991).
169. Sternberg,D., Honigwachs-Sha'anani,J., Brosh,N., Malik,Z., Burstein,Y., & Zipori,D. Restrictin-P/stromal activin A, kills its target cells via an apoptotic mechanism. *Growth Factors* **12**, 277-287 (1995).
170. Shoham,T., Parameswaran,R., Shav-Tal,Y., Barda-Saad,M., & Zipori,D. The mesenchymal stroma negatively regulates B cell lymphopoiesis through the expression of activin A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **996**, 245-260 (2003).
171. Hedger,M.P., Phillips,D.J., & de Kretser,D.M. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1beta or interleukin 6 in vitro. *Cytokine* **12**, 595-602 (2000).
172. Casas,E., Stone,R.T., Keele,J.W., Shackelford,S.D., Kappes,S.M., & Koohmaraie,M. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. *J. Anim Sci.* **79**, 854-860 (2001).
173. Ng,L., Pathak,S.D., Kuan,C., Lau,C., Dong,H., Sodt,A., Dang,C., Avants,B., Yushkevich,P., Gee,J.C., Haynor,D., Lein,E., Jones,A., &

- Hawrylycz, M. Neuroinformatics for genome-wide 3D gene expression mapping in the mouse brain. *IEEE/ACM. Trans. Comput. Biol. Bioinform.* **4**, 382-393 (2007).
174. Lein, E.S., Hawrylycz, M.J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A.F., Boguski, M.S., Brockway, K.S., Byrnes, E.J., Chen, L., Chen, L., Chen, T.M., Chin, M.C., Chong, J., Crook, B.E., Czaplinska, A., Dang, C.N., Datta, S., Dee, N.R., Desaki, A.L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T.A., Donelan, M.J., Dong, H.W., Dougherty, J.G., Duncan, B.J., Ebbert, A.J., Eichele, G., Estin, L.K., Faber, C., Facer, B.A., Fields, R., Fischer, S.R., Fliss, T.P., Frensley, C., Gates, S.N., Glattfelder, K.J., Halverson, K.R., Hart, M.R., Hohmann, J.G., Howell, M.P., Jeung, D.P., Johnson, R.A., Karr, P.T., Kaval, R., Kidney, J.M., Knapik, R.H., Kuan, C.L., Lake, J.H., Laramée, A.R., Larsen, K.D., Lau, C., Lemon, T.A., Liang, A.J., Liu, Y., Luong, L.T., Michaels, J., Morgan, J.J., Morgan, R.J., Mortrud, M.T., Mosqueda, N.F., Ng, L.L., Ng, R., Orta, G.J., Overly, C.C., Pak, T.H., Parry, S.E., Pathak, S.D., Pearson, O.C., Puchalski, R.B., Riley, Z.L., Rockett, H.R., Rowland, S.A., Royall, J.J., Ruiz, M.J., Sarno, N.R., Schaffnit, K., Shapovalova, N.V., Sivisay, T., Slaughterbeck, C.R., Smith, S.C., Smith, K.A., Smith, B.I., Sood, A.J., Stewart, N.N., Stumpf, K.R., Sunkin, S.M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C.D., Thaller, C., Thompson, C.L., Varnam, L.R., Visel, A., Whitlock, R.M., Wohnoutka, P.E., Wolkey, C.K., Wong, V.Y., Wood, M., Yaylaoglu, M.B., Young, R.C., Youngstrom, B.L., Yuan, X.F., Zhang, B., Zwingman, T.A., & Jones, A.R. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* **445**, 168-176 (2007).
175. Trayner, I.D., Bustorff, T., Etches, A.E., Mufti, G.J., Foss, Y., & Farzaneh, F. Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, alpha1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk. Res.* **22**, 537-547 (1998).
176. Bronfman, M., Ponce, C., Rojas, S., Roth, A., Loyola, G., Vollrath, V., & Chianale, J. Enhanced differentiation of HL-60 leukemia cells to macrophages induced by ciprofibrate. *Eur. J. Cell Biol.* **77**, 214-219 (1998).
177. Nagata, Y., Takahashi, N., Davis, R.J., & Todokoro, K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* **92**, 1859-1869 (1998).
178. Nagata, Y. & Todokoro, K. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* **94**, 853-863 (1999).
179. Huang, H.M., Chang, T.W., & Liu, J.C. Basic fibroblast growth factor antagonizes activin A-mediated growth inhibition and hemoglobin

- synthesis in K562 cells by activating ERK1/2 and deactivating p38 MAP kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1247-1252 (2004).
180. Huang,H.M., Chiou,H.Y., & Chang,J.L. Activin A induces erythroid gene expressions and inhibits mitogenic cytokine-mediated K562 colony formation by activating p38 MAPK. *J. Cell Biochem.* **98**, 789-797 (2006).
181. Nagata,Y. & Todokoro,K. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* **94**, 853-863 (1999).
182. Huang,H.M., Li,Y.C., & Chung,M.H. Activin A induction of erythroid differentiation through MKK6-p38alpha/p38beta pathway is inhibited by follistatin. *J. Cell Physiol* **223**, 687-694 (2010).
183. Soderberg,S.S., Karlsson,G., & Karlsson,S. Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1176**, 55-69 (2009).
184. Larsson,J. & Karlsson,S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* **24**, 5676-5692 (2005).
185. Maguer-Satta,V., Bartholin,L., Jeanpierre,S., Ffrench,M., Martel,S., Magaud,J.P., & Rimokh,R. Regulation of human erythropoiesis by activin A, BMP2, and BMP4, members of the TGFbeta family. *Exp. Cell Res.* **282**, 110-120 (2003).
186. Huang,H.M., Chang,T.W., & Liu,J.C. Basic fibroblast growth factor antagonizes activin A-mediated growth inhibition and hemoglobin synthesis in K562 cells by activating ERK1/2 and deactivating p38 MAP kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1247-1252 (2004).
187. Welham,M.J., Duronio,V., Sanghera,J.S., Pelech,S.L., & Schrader,J.W. Multiple hemopoietic growth factors stimulate activation of mitogen-activated protein kinase family members. *J. Immunol.* **149**, 1683-1693 (1992).
188. Zhang,W. & Liu,H.T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**, 9-18 (2002).
189. Kim,S.C., Hahn,J.S., Min,Y.H., Yoo,N.C., Ko,Y.W., & Lee,W.J. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood* **93**, 3893-3899 (1999).
190. Pages,G., Lenormand,P., L'Allemain,G., Chambard,J.C., Meloche,S., & Pouyssegur,J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and

- p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 8319-8323 (1993).
191. Kang,C.D., Do,I.R., Kim,K.W., Ahn,B.K., Kim,S.H., Chung,B.S., Jhun,B.H., & Yoo,M.A. Role of Ras/ERK-dependent pathway in the erythroid differentiation of K562 cells. *Exp. Mol. Med.* **31**, 76-82 (1999).
192. Nagata,Y., Takahashi,N., Davis,R.J., & Todokoro,K. Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood* **92**, 1859-1869 (1998).
193. Nagata,Y. & Todokoro,K. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* **94**, 853-863 (1999).
194. Pace,B.S., Qian,X.H., Sangerman,J., Ofori-Acquah,S.F., Baliga,B.S., Han,J., & Critz,S.D. p38 MAP kinase activation mediates gamma-globin gene induction in erythroid progenitors. *Exp. Hematol.* **31**, 1089-1096 (2003).
195. Witt,O., Monkemeyer,S., Ronndahl,G., Erdlenbruch,B., Reinhardt,D., Kanbach,K., & Pekrun,A. Induction of fetal hemoglobin expression by the histone deacetylase inhibitor apicidin. *Blood* **101**, 2001-2007 (2003).
196. Huang,H.M., Chiou,H.Y., & Chang,J.L. Activin A induces erythroid gene expressions and inhibits mitogenic cytokine-mediated K562 colony formation by activating p38 MAPK. *J. Cell Biochem.* **98**, 789-797 (2006).
197. Cocolakis,E., Lemay,S., Ali,S., & Lebrun,J.J. The p38 MAPK pathway is required for cell growth inhibition of human breast cancer cells in response to activin. *J. Biol. Chem.* **276**, 18430-18436 (2001).
198. Benny Klimek,M.E., Aydogdu,T., Link,M.J., Pons,M., Koniaris,L.G., & Zimmers,T.A. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1548-1554 (2010).
199. Jespersen,J., Kjaer,M., & Schjerling,P. The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **16**, 74-82 (2006).
200. DiMascio,L., Voermans,C., Uqoezwa,M., Duncan,A., Lu,D., Wu,J., Sankar,U., & Reya,T. Identification of adiponectin as a novel hemopoietic stem cell growth factor. *J. Immunol.* **178**, 3511-3520 (2007).
201. Fantuzzi,G. & Faggioni,R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 437-446 (2000).

202. Metcalf,D. Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**, 485-491 (2008).
203. Puthuchery,Z., Harridge,S., & Hart,N. Skeletal muscle dysfunction in critical care: wasting, weakness, and rehabilitation strategies. *Crit Care Med.* **38**, S676-S682 (2010).
204. Glass,D. & Roubenoff,R. Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1211**, 25-36 (2010).
205. Qin,W., Bauman,W.A., & Cardozo,C. Bone and muscle loss after spinal cord injury: organ interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1211**, 66-84 (2010).
206. Dumont,N., Bouchard,P., & Frenette,J. Neutrophil-induced skeletal muscle damage: a calculated and controlled response following hindlimb unloading and reloading
1. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **295**, R1831-R1838 (2008).
207. Allen,D.L., Cleary,A.S., Lindsay,S.F., Loh,A.S., & Reed,J.M. Myostatin expression is increased by food deprivation in a muscle-specific manner and contributes to muscle atrophy during prolonged food deprivation in mice. *J. Appl. Physiol* **109**, 692-701 (2010).
208. Allen,D.L., McCall,G.E., Loh,A.S., Madden,M.C., & Mehan,R.S. Acute daily psychological stress causes increased atrophic gene expression and myostatin-dependent muscle atrophy. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **299**, R889-R898 (2010).
209. Benny Klimek,M.E., Aydogdu,T., Link,M.J., Pons,M., Koniaris,L.G., & Zimmers,T.A. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1548-1554 (2010).
210. Liu,C.M., Yang,Z., Liu,C.W., Wang,R., Tien,P., Dale,R., & Sun,L.Q. Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Gene Ther.* **15**, 155-160 (2008).
211. Costelli,P., Muscaritoli,M., Bonetto,A., Penna,F., Reffo,P., Bossola,M., Bonelli,G., Doglietto,G.B., Baccino,F.M., & Rossi,F.F. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur. J. Clin. Invest* **38**, 531-538 (2008).
212. Benny Klimek,M.E., Aydogdu,T., Link,M.J., Pons,M., Koniaris,L.G., & Zimmers,T.A. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1548-1554 (2010).

213. Benabdallah,B.F., Bouchentouf,M., & Tremblay,J.P. Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal. *Transplantation* **79**, 1696-1702 (2005).
214. Fakhfakh,R., Michaud,A., & Tremblay,J.P. Blocking the myostatin signal with a dominant negative receptor improves the success of human myoblast transplantation in dystrophic mice. *Mol. Ther.* **19**, 204-210 (2011).
215. Benabdallah,B.F., Bouchentouf,M., Rousseau,J., Bigey,P., Michaud,A., Chapdelaine,P., Scherman,D., & Tremblay,J.P. Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice. *Cell Transplant.* **17**, 337-350 (2008).
216. Castro-Gago,M., Blanco-Barca,M.O., Eiris-Punal,J., Carneiro,I., Arce,V.M., & Devesa,J. Myostatin expression in muscular dystrophies and mitochondrial encephalomyopathies. *Pediatr. Neurol.* **34**, 281-284 (2006).
217. Castro-Gago,M., Gomez-Lado,C., Eiris-Punal,J., Carneiro,I., Arce,V.M., & Devesa,J. Muscle myostatin expression in children with muscle diseases. *J. Child Neurol.* **22**, 38-40 (2007).