MEIRICRIS TOMAZ DA SILVA

PAPEL DO ADRENOCEPTOR BETA 2 NA
REGENERAÇÃO MUSCULAR
ESQUELÉTICA

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais do
Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

MEIRICRIS TOMAZ DA SILVA

PAPEL DO ADRENOCEPTOR BETA 2 NA
REGENERAÇÃO MUSCULAR
ESQUELÉTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:
Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Meiricris Tomaz da.

Papel do adrenoceptor beta 2 na regeneração muscular esquelética /
Meiricris Tomaz da Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração:
Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Plasticidade
morfofuncional do músculo esquelético com ênfase em regeneração
muscular.

Versão do título para o inglês: The role of beta 2 adrenoceptor in
skeletal muscle regeneration.

1. Adrenoceptor $\beta 2$ 2. Akirina1 3. Contração muscular 4.
Macrófagos 5. Regeneração muscular esquelética 6. Smad I.
Miyabara, Profa. Dra. Elen Haruka II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0119/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Meiricris Tomaz da Silva.

Título da Tese: Papel do adrenoceptor beta 2 na regeneração muscular esquelética.

Orientador(a): Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **107** nas fls. **108** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Elen Haruka Miyabara**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*Papel do receptor beta 2 adrenérgico na regeneração muscular esquelética*" do qual participam o(s) alunos **Meiricris Tomaz da Silva, Lucila Hernandes da Silva, Thiago Loureiro Goldmann**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **15.07.2011, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 18 de julho de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho:

À Deus, que com toda sua sabedoria soube dosar em minha vida momentos de alegria, de tristeza, de compreensão, de revolta, de conhecimento e de ignorância. Mas principalmente me deu muita coragem, força e determinação para seguir lutando em busca dos meus sonhos. Obrigada meu Pai por mais essa conquista.

À minha Mammy Vilma e Papí Wladimir. Mais uma vez vocês estiveram ao meu lado lutando e me dando forças para a batalha. Sei o quanto vocês sofreram por eu estar longe e por eu ter perdido tantos momentos em família, mas sei que vocês entendem e apoiam minha escolha. Jamais conseguirei demonstrar toda minha gratidão por tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim. Essa conquista é nossa! Amo vocês com toda a força do universo!!!

AGRADECIMENTOS

À toda minha família:

Nane, Lí, Nuno, Kiko, Edílson, Sá, Nando, Murilo, Mayra, Taí,

Vocês são simplesmente sensacionais! Obrigada por todo amor e carinho e por todos os churrascos e festas realizadas durante as minhas visitas.

Vovuxa Eba,

A senhora é um espelho de força, coragem e dedicação. Obrigada por toda ajuda e carinho!

Tia Sílvia,

Obrigada por me acolher tão bem em sua casa no início da minha caminhada, por todas as conversas, por toda diversão e por todo carinho!

“Não escolhemos a família em que vivemos
Mas a vida nos mostra
Que família no final é tudo que temos.
Família é a que nos acolhe e nos mostra o que é união
Pode ser uma família de amigos
Ou aquela que o sangue bate em nosso coração.

Podemos não ter a família mais rica
Ou a mais inteligente
Mas com certeza temos a mais divertida.
E que certamente esta presente.
Toda família tem brigas, desavenças e intrigas.
Mas no final tudo se explica
E no final do ano é bonito ver a família toda reunida.

Podemos perder tudo na vida um dia
Mas com uma coisa podemos sempre contar
O apoio da nossa família.
Não faça de seus parentes um simples ninguém
Sempre mantenha contado com os parentes próximos
E os parentes distantes também.
Família é a única coisa que você deve valorizar
Pois nas horas mais difíceis
Serão os únicos que irão te ajudar.”

Eduardo Miguel Borges

À minha orientadora Elen Haruka Miyabara,

Muito obrigada por me acolher em seu laboratório! Obrigada pela confiança em meu trabalho, obrigada por toda dedicação, paciência e atenção dispensada. Obrigada pela oportunidade de aprender com você. Obrigada por tudo que você tem feito por mim!

To Sir With Love

Those school girl days
Of telling tales and biting nails are gone
But in my mind
I know they will still live on and on

But how do you thank someone
Who has taken you from crayons to perfume
It isn't easy but I'll try

If you wanted the sky I would write across the sky
in letters that would soar a thousand feet high
To Sir, with love

The time has come
for closing books and long last looks must end
And as I leave
I know that I am leaving my best friend
A friend who taught me right from wrong
and weak from strong
That's a lot to learn

What, what can I give you in return?
If you wanted the moon I would try to make a start
but I would rather you let me give my heart
To Sir with love

Those awkward years have hurried by
why did they fly away?
Why is it Sir, children grow up to be people some
day?
What takes the place of climbing trees and dirty knees
in the world outside?

What is there for you I could buy?
If you wanted the world I'd surround it with a wall
I'd scrawl these words with letters ten feet tall

Don Black and Mark London

A todos os professores e mestres que passaram por minha vida e que compartilharam seu conhecimento comigo. Foi da admiração por vocês que esse sonho nasceu em mim.

O meu muito obrigado à minha eterna professora e agora grande amiga Viviane Balísardo Minamoto. Muito obrigada por tudo que você fez por mim, por sempre acreditar na minha capacidade e sempre me encorajar a lutar!

Aos professores Anselmo S. Moriscot, Jackson C. Bittencourt, Luiz R. G. Britto, Ruy G. Jaeger e Niels O. S. Câmara por conceder o uso de alguns equipamentos e pela colaboração na execução deste trabalho.

*Aos funcionários Renivaldo de Souza, Patrícia R. C. Rocha e Marta M. S. Righetti,
Rosana S. Prisco*

À minha inseparável amiga Patrícia Fessel,

Sempre ao meu lado me dando apoio, ouvindo minhas reclamações e até secando minhas lágrimas. Obrigada pela companhia, pelo carinho, por toda a torcida e principalmente pelo amor e amizade!

Aos meus amigos de laboratório,

Primeiramente Talita Conte, por tudo que você me ensinou assim que eu cheguei no laboratório e por me acolher e dividir comigo o cafofo do Osama. Te desejo toda sorte e sucesso do mundo, você merece!!!

Lucila H. Silva, por compartilhar comigo grandes e divertidos momentos de bancada, pela ajuda na elaboração deste trabalho, e também por me acolher em sua casa juntamente com sua família. Vocês me abrigaram de braços abertos e me trataram muito bem no momento que eu mais precisava, obrigada!

À minha amiga guerreira Tábata Leal, já rimos juntas e já sofremos juntas, mas o mais importante é que sempre apoiamos uma à outra. Você tem um coração enorme e tenho certeza que terá muitas alegrias e conquistas em seu caminho.

Ao meu amigo Marcelo Pereira, um rapaz dedicado e comprometido com seu trabalho, que sabe o que quer e luta por isso. Tenho muito orgulho e admiração por você meu caro. Você é o cara!

Obrigada por toda ajuda e colaboração de vocês!

História, nossas histórias...

Dias de luta, dias de glória!

À Lislaíne Wensing e Adriane Siqueira pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Departamento de Anatomia, o meu muito obrigado!

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho...

...os meus sinceros agradecimentos.

*"Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto.
A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para
aprender."*

Clarice Lispector

RESUMO

Silva MT. Papel do adrenoceptor beta 2 na regeneração muscular esquelética. [tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A estimulação do adrenoceptor β_2 causa efeitos benéficos na estrutura e função de músculos esqueléticos em regeneração; sendo assim, este estudo buscou compreender o papel deste receptor no processo de regeneração muscular. Desta forma, o papel do adrenoceptor β_2 foi investigado na regeneração do músculo esquelético. Os músculos *tibialis anterior* de camundongos *knockout* para o adrenoceptor β_2 (β_2 KO) foram criolesados e analisados após 1, 3, 10 e 21 dias. O papel do adrenoceptor β_2 na regeneração do músculo esquelético foi avaliado por meio da análise de aspectos morfológicos e contráteis, atuação de macrófagos M1 e M2, conteúdo de AMPc e ativação de elementos da via de sinalização TGF- β /smad. Os músculos em regeneração dos animais β_2 KO apresentaram redução do calibre de suas fibras musculares e da função contrátil em 10 dias após criolesão quando comparados àqueles dos animais selvagens. O aumento do conteúdo de AMPc nos músculos em 10 dias após criolesão foi atenuado na ausência do adrenoceptor β_2 . Adicionalmente, os músculos em regeneração dos animais com deleção do adrenoceptor β_2 apresentaram aumento da inflamação e do número de macrófagos em 3 e 10 dias após lesão, predominância de macrófagos M1, diminuição da ativação de T β R-I e smad2/3 e da expressão de smad4 em 3 dias após lesão, e aumento da expressão de akirina1 em 10 dias após lesão quando comparados aos músculos dos animais selvagens. Os resultados apresentados sugerem que o adrenoceptor β_2 contribui para a regulação das fases iniciais da regeneração muscular, especialmente no controle do recrutamento de macrófagos em músculos em regeneração por meio da ativação da via de sinalização T β R-I/sm2/3 e redução da expressão de akirina1. Estes achados podem servir de base para o futuro desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas para prevenir ou tratar lesões musculares.

Palavras-chave: Adrenoceptor β_2 . Akirina1. Contração muscular. Macrófagos. Regeneração muscular esquelética. Smad.

ABSTRACT

Silva MT. The role of beta 2 adrenoceptor in skeletal muscle regeneration. [Ph. D. thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

β_2 -adrenergic stimulation causes beneficial effects on structure and function of regenerating muscles; therefore this study aimed understand the role of this receptor in the muscle regenerative process. In this study, we investigated the role of the β_2 -adrenoceptor in skeletal muscle regeneration. Tibialis anterior muscles from β_2 -adrenoceptor knockout (β_2 KO) mice were cryolesioned and analysed after 1, 3, 10, and 21 days. The role of β_2 -adrenoceptor on regenerating muscles was evaluated through the analysis of structural and contractile aspects, M1 and M2 macrophage profile, cAMP content, and activation of TGF- β /smad signalling elements. Regenerating muscles from β_2 KO mice showed diminished calibre of regenerating myofibres, and decreased muscle contractile function at 10 days when compared with those from wild-type. The augment in cAMP content in muscles at 10 days post-injury was attenuated in the absence of the β_2 -adrenoceptor. Moreover, there was an increase in inflammatory process and in the number of macrophages in regenerating muscles lacking the β_2 -adrenoceptor at 3 and 10 days, a prevalence of M1 macrophage phenotype, a reduction in T β R-I and smad2/3 activation, and in the smad4 expression at 3 days, and an increase in akirin1 expression at 10 days in muscles from β_2 KO mice when compared to those from wild-type. Our data suggest that the β_2 -adrenoceptor contributes to the control of the initial stages of muscle regeneration, especially in the regulation of macrophage recruitment in regenerating muscles through activation of T β R-I/sm2/3 and reduction in akirin1 expression. These findings have implications for the future investigation of better therapeutic strategies to prevent or treat muscle damages.

Keywords: Akirin1. β_2 -adrenoceptor. Contraction. Macrophage. Skeletal muscle regeneration. Smad

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação dos elementos da via de sinalização TGF β /ActRII/smad.....	30
Figura 2 - Representação dos elementos da via de sinalização β_2 -adrenérgica localizados no sarcolema.....	31
Figura 3 - Representação da via de sinalização β_2 -adrenérgica: G α_s -AC-AMPC...32	
Figura 4 - Representação da via de sinalização não clássica β_2 -adrenérgica: PI3K/AKT/mTOR.....	34
Figura 5 - Representação da expressão do gene do adrenoceptor β_2 contendo a interposição do cassete de neomicina no músculo esquelético do camundongo β_2 KO.....	42
Figura 6 - Esquema representativo do experimento de mensuração da função contrátil muscular nos camundongos FVB e β_2 KO.....	51
Figura 7A - Imagem representativa da secção transversal de músculos dos animais FVB e β_2 KO corados com azul de toluidina.	54
Figura 7B - Porcentagem de fibras musculares necrosadas no músculo dos animais FVB e β_2 KO analisados em 1 dia após a criolesão.....	56
Figura 7C - Porcentagem da área com infiltrado inflamatório no músculos dos animais FVB e β_2 KO analisados em 3 e 10 dias após lesão.....	56
Figura 7D - Porcentagem do número de fibras musculares com núcleo centralizado nos músculos dos animais FVB e β_2 KO analisados em 10 e 21 dias após lesão.....	57
Figura 8 - Frequência de distribuição da área de secção transversal das fibras musculares dos músculos dos animais FVB e β_2 KO.....	58
Figura 9 - Imagem representativa da secção transversal dos músculos corados com picrossírius <i>red</i> e densidade de área do tecido conjuntivo nos músculos controle e criolesados e analisado após 10 e 21 dias dos animais FVB e β_2 KO.....	59
Figura 10 - Incidência de macrófagos por milímetro cúbico (mm ³) nos músculos de camundongos FVB e β_2 KO controles e criolesados e analisado após 3 e 10 dias...60	
Figura 11 - Expressão gênica de iNOS (A), IL-1 β (B), arginase-1 (C) e fizz-1 (D) analisadas em 1, 3 e 10 dias após criolesão nos músculos dos animais FVB e β_2 KO.....	61
Figura 12 - Porcentagem da população positiva para CD11b e de células positivas para CD86 e CD206 dentro da população positiva para CD11b nos músculos	

controle e criolesados analisados em 3 e 10 dias após lesão dos animais FVB e β_2 KO.....64

Figura 13 - Imagem representativa da secção transversal dos músculos imunomarcados com T β R-I fosforilado e porcentagem da área positiva para T β R-I fosforilado nos músculos controle e criolesados e analisados após 3 dias dos animais FVB e β_2 KO.....66

Figura 14 - Imagem representativa da secção transversal dos músculos imunomarcados com smad2/3 e incidência de núcleos positivos para smad2/3 por milímetro quadrado (mm²) nos músculos controle e criolesados e analisados após 3 dias dos animais FVB e β_2 KO.....67

Figura 15 - Expressão de smad4 e akirina1 e suas respectivas densitometrias nos músculos dos animais FVB e β_2 KO.....69

Figura 16 - Níveis de AMPc nos músculos dos camundongos FVB e β_2 KO.....70

Figura 17 - Comparação da força tetânica máxima (A, mN), da força específica (B) e da produção de força durante o protocolo de 10 contrações musculares (C, resistência à fadiga) analisadas nos músculos controle e criolesados dos animais FVB e β_2 KO.....72

Figura 18 - Representação da via de sinalização β_2 -adrenérgica e da transativação do receptor T β R-I.....76

Figura 19 - Representação da via de sinalização β_2 -adrenérgica e da transativação do receptor T β R-I em caso de lesão e deleção do adrenoceptor β_281

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais dos camundongos β_2 KO e FVB.....	41
Tabela 2 - Sequência de primers utilizados.....	41
Tabela 3 - Comparação entre PC (g) e PM (mg) dos camundongos FVB e β_2 KO...	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_i - concentração de cálcio intracelular

4EBP1 - *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*

AC - adenilil ciclase

ActRI ou TβR-I - receptor activina tipo I

ActRII - receptor activina tipo II

AKT – proteína kinase B

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

AST - área de secção transversal

ATP - adenosina trifosfato

EGF - fator de crescimento epidermal

eif4E - *euchariotic initiation factor 4E*

FGF - fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*)

FOXO - fator de transcrição *forkhead box O*

FVB - camundongo selvagem

GPCR - receptores acoplados à proteína G (*guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor*)

GSK3β - glicogênio sintase quinase 3β

HGF - fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor*)

IFN - interferon

IGF - fatores semelhantes à insulina (*insulin-like growth factor*)

IL - interleucina

iNOS - *inducible nitric oxide synthase*

LHS - lipase hormônio-sensível

MAPK-1 (*mitogen-activated protein kinase phosphatase-1*)

MRFs - fatores regulatórios miogênicos

mTOR - *mammalian target of rapamycin*

mTORC1 - complexo alvo da rapamicina em mamíferos 1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*)

muRF-1 - muscle *ring finger-1*

Myf-5 - fator miogênico 5 (*myogenic factor 5*)

Myo-D - fator de determinação miogênica (*myogenic determination factor*)

Na⁺ - íons de sódio

NO - óxido nítrico

PDK - 3` - *phosphoinositide-dependent protein kinase 1*

PI3K - phosphoinositol 3-kinase

PIP2 - *phospholipid phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*

PIP3 - *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*

PKA - proteína kinase A

rCGRP - *rat calcitonin gene-related peptide*

RNAi - RNA de interferência

S/TK - receptores do tipo serina treonina kinase

S6K - 70 kDa ribosomal protein S6 kinase

TFIID - o fator de transcrição IID

TGF - fator de crescimento e transformação (*transforming growth factor*)

Th - células *T-helper*

TNF - *tumor necrosis factor*

Túbulo T - túbulo transverso

β_2 KO - camundongo *knockout* para o receptor β_2 -adrenérgico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Tecido muscular esquelético	20
1.2 Regeneração do músculo esquelético	24
1.3 Adrenoceptores β_2 no músculo esquelético	30
1.4 Justificativa e relevância do estudo	36
2 OBJETIVO	37
2.1 Objetivo 1	37
2.2 Objetivo 2	37
2.3 Objetivo 3	37
2.4 Objetivo 4	37
3 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS	38
3.1 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo 1	38
3.2 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo 2	38
3.3 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo 3	39
3.4 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo 4	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Animais	40
4.2 Grupos experimentais	40
4.3 Genotipagem	41
4.4 Protocolo de criação	43
4.5 Histologia	43
4.6 Mensuração do conteúdo de AMP _c tecidual	44
4.7 Análise imuno-histoquímica	44
4.7.1 Anticorpos para imuno-histoquímica	44
4.8 Análise quantitativa e morfométrica	45
4.9 Mensuração da expressão proteica	46
4.9.1 Anticorpos para western blot	47
4.10 Análise da expressão gênica	47
4.10.1 Transcrição reversa	47
4.10.2 Sequência de primers	48
4.10.3 PCR em tempo real	48
4.11 Citometria de fluxo	49

4.12 Mensuração da função muscular	50
4.13 Análise estatística	51
5 RESULTADOS.....	52
5.1 Peso corporal e peso muscular	52
5.2 Histologia	53
5.3 Densidade de tecido conjuntivo	58
5.4 Número e fenótipo dos macrófagos	60
<i>5.4.1 Incidência de macrófagos positivos para Mac387</i>	<i>60</i>
<i>5.4.2 Genes associados aos macrófagos M1 e M2.....</i>	<i>60</i>
<i>5.4.3 População de células positivas para CD11b, CD86 e CD206</i>	<i>63</i>
5.5 Ativação da via TβR-I e smad2/3	66
5.6 Expressão de smad4 e akirina1	68
5.7 Níveis de AMPc.....	70
5.8 Forças tetânica máxima, específica e resistência à fadiga	70
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido muscular esquelético

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo humano (Grefte et al., 2007) compreende de 40 a 60% de toda a massa corporal, tem como função a sustentação e movimentação coordenada do corpo, união das peças ósseas e determinação de posições e postura do esqueleto (Junqueira, Carneiro, 2013; Lieber, 2002; Ten Broek et al., 2010). Além disso, o músculo esquelético também exerce a função de regulador metabólico, como por exemplo, armazenando glicogênio, sendo que a perda de massa muscular devido ao envelhecimento ou doenças degenerativas altera as habilidades físicas e acarreta disfunções metabólicas, tais como a resistência à insulina ou a osteoporose (Zanou, Gailly, 2013). O músculo esquelético é composto por grupos de feixes (fascículos) de fibras musculares, as quais apresentam formato poligonal e alongado e originam-se da fusão de mioblastos, por isso são multinucleadas, sendo que em condições basais os núcleos estão localizados na periferia das fibras (Grefte et al., 2007; Junqueira, Carneiro, 2013).

A musculatura esquelética é envolvida por três camadas de tecido conjuntivo: epimísio, perimísio e endomísio. O tecido conjuntivo tem a função de manter as fibras musculares unidas, fazendo com que a contração gerada por cada fibra muscular ocorra de forma homogênea e seja transmitida para os tendões e ossos, também é responsável por conferir suporte a uma extensa rede de capilares e nervos (Grefte et al., 2007; Junqueira, Carneiro, 2013; Takala, Virtanen, 2000). O epimísio é a camada de tecido conjuntivo que envolve toda a superfície muscular, o perimísio envolve os feixes de fibras e cada fibra muscular é circundada pelo endomísio, que é formado pela lâmina basal da fibra muscular e pelas fibras reticulares. De acordo com Best et al. (2001) e Kovanen (2002) o epimísio contém predominantemente o colágeno tipo I, o perimísio os colágenos tipo I e III, e o endomísio os colágenos tipo I, III e V. O colágeno tipo I forma fibras paralelas fortes e confere força tensil e rigidez (Kovanen, 2002; Stauber et al., 1996;), enquanto o colágeno tipo III forma uma rede mais frouxa e confere complacência ao tecido. O colágeno IV é exclusivo da membrana basal, sendo responsável pela manutenção da estabilidade mecânica da fibra muscular (Kjaer, 2004).

Para gerar grande força de tensão, cada fibra muscular contém específicas cadeias de moléculas denominadas integrinas (Mayer, 2003) e complexo distrofina-glicoproteína (Michele, Campbell, 2003). Esse complexo de proteínas conecta o aparato contrátil à matriz extracelular por meio do sarcolema (Charge, Rudnicki, 2004; Giancotti, Ruoslahti, 1999; Kääriäinen et al., 2000; Sunada, Campbell, 1995).

Além de possuir tecido conjuntivo, o músculo esquelético é altamente vascularizado e innervado, o que garante a sua nutrição e os estímulos essenciais para a execução de suas funções (Charge, Rudnicki, 2004; Grefte et al., 2007).

O citoplasma da fibra muscular é constituído por miofibrilas, que são estruturas cilíndricas de cerca de 1 a 2 μm de diâmetro (Junqueira, Carneiro, 2013). As miofibrilas estão dispostas ao longo de toda a fibra muscular e apresentam um padrão de estriamento devido à presença de bandas claras e escuras alternadas. As bandas claras são denominadas de bandas isotrópicas (I) e as bandas escuras são chamadas de bandas anisotrópicas (A) (Junqueira, Carneiro, 2013; Macintosh et al., 2006). No centro de cada banda A, encontra-se uma banda H e no centro de cada banda I existe uma linha transversal escura, a linha Z (Junqueira, Carneiro, 2013; Macintosh et al., 2006). A região entre duas linhas Z é conhecida como a unidade funcional contrátil do músculo esquelético e é denominada de sarcômero (Lieber, 2002).

A estrutura do sarcômero é composta por uma variedade de proteínas: actina, miosina, tropomiosina, troponina, titina, entre outras (Junqueira, Carneiro, 2013). A actina é um filamento fino que apresenta estrutura helicoidal formada por duas cadeias simples de monômeros torcidas uma sobre a outra, em hélice dupla (Junqueira, Carneiro, 2013), localiza-se perpendicularmente em cada lado da linha Z e, estende-se até a semibanda A (Junqueira, Carneiro, 2013; Macintosh et al., 2006). A miosina é um filamento mais espesso, localiza-se na banda anisotrópica (Junqueira, Carneiro, 2013; Macintosh et al., 2006) e sua estrutura molecular compreende duas porções principais: a cabeça globular em que há sítios de ligação para adenosina trifosfato (ATP) e para actina; e a cauda que é responsável por se ligar a outras caudas de outras moléculas de miosina para formar os filamentos grossos. Esses filamentos grossos são constituídos de cerca de 300 moléculas de miosina rearranjadas de forma a deixar as cabeças globulares em direções opostas, tal posicionamento permite a interação da miosina com a actina durante a contração muscular (Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006). A tropomiosina é uma proteína

formada por duas cadeias polipeptídicas que se encontram na superfície do filamento de actina e está associada a várias moléculas de troponina que também está localizada ao longo do filamento de actina (Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006). A troponina é formada por três subunidades denominadas de acordo com os compostos que interagem ou com as funções que exercem: a troponina-T, que liga a troponina à tropomiosina e forma o complexo troponina-tropomiosina, a troponina-C que tem afinidade pelos íons de cálcio e a troponina-I que se liga à actina quando não há cálcio presente, exercendo assim, função inibitória à interação da tropomiosina com a actina (Ferrante et al., 2011; Macintosh et al., 2006; Schoenfeld, 2010; Wei, Jin, 2011). A titina é a maior proteína no corpo, sendo do tamanho de meio sarcômero aproximadamente, tem um importante papel na resistência passiva do músculo (Smith et al., 2013).

A base mecânica da contração muscular é semelhante para todos os tipos de fibras musculares e resulta do “mecanismo de deslizamento” do filamento espesso de miosina sobre o filamento fino de actina após a ativação neural e com gasto energético (Huxley, 2000). Portanto, a contração muscular é controlada pelo sistema nervoso central através da unidade motora caracterizada pelo neurônio motor e pelas fibras musculares que este inerva (Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006). O neurônio motor é composto por corpo celular (*soma*), dendritos que recebem sinais de outros neurônios, e axônio que envia impulsos nervosos (potenciais de ação) para as fibras musculares desencadeando, assim, a contração muscular (Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006). O potencial de ação é caracterizado pela despolarização do neurônio motor que consiste na entrada de íons de sódio (Na^{+2}) no meio intracelular, desencadeando, conseqüentemente, na inversão da polaridade da membrana plasmática da célula, que torna o seu meio intracelular positivo e o extracelular negativo (Macintosh et al., 2006). O neurônio motor despolarizado secreta um neurotransmissor chamado acetilcolina na junção neuromuscular, o qual se liga aos seus receptores pós-sinápticos localizados no sarcolema das fibras musculares, tal ligação acarreta na despolarização do sarcolema e na propagação do potencial de ação ao longo das fibras musculares (Lieber, 2002; Smith et al., 2013). O potencial de ação dissipa-se ao longo do túbulo transversal (túbulo T) até alcançar o retículo sarcoplasmático e induzir a liberação de cálcio para o meio intracelular (Lieber, 2002; Smith et al., 2013). O cálcio liberado se associa à troponina, alterando a conformação do complexo troponina-tropomiosina, ou seja, a

tropomiosina é empurrada para dentro da hélice de actina e desta forma, a actina fica disponível para interagir com a cabeça das moléculas de miosina (Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006). A miosina se liga fortemente à actina, e ocorre o deslizamento da actina sobre a miosina, acarretando no encurtamento do sarcômero (Junqueira, Carneiro, 2013). Para que a contração muscular ocorra é necessário ATP, sendo assim, o músculo esquelético precisa de reservas metabólicas e armazenamento de carboidratos e ácidos graxos (Smith et al., 2013). Quando o impulso nervoso cessa, o cálcio é bombeado de volta para o retículo sarcoplasmático pela ação da ATPase (enzima presente na membrana do retículo sarcoplasmático) e consequentemente a interação da actina com a miosina é desfeita, acarretando no relaxamento da fibra muscular (Lieber, 2002).

As fibras musculares possuem diferentes propriedades contráteis e metabólicas, portanto, são classificadas em diferentes tipos de fibras musculares (Lieber, 2002). De maneira geral, as fibras musculares podem ser classificadas em fibras do tipo I, tipo IIa, IIx e IIb que não é expressa em humanos (Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006; Smith et al., 2013). As fibras musculares do tipo I apresentam contração lenta, possuem alta vascularização, grande quantidade de mitocôndrias e de mioglobinas e metabolismo oxidativo, o que lhes garantem maior resistência à fadiga (Lieber, 2002; Schiaffino, 2010). Entretanto, as fibras musculares do tipo IIb apresentam contração rápida, possuem menor vascularização, menor quantidade de mitocôndrias e mioglobinas e o metabolismo é predominantemente glicolítico, sendo assim, são menos resistentes à fadiga (Schiaffino, 2010). As fibras musculares do tipo IIa apresentam características intermediárias a esses dois tipos de fibras, ou seja, possuem quantidade moderada de mitocôndrias e mioglobinas e metabolismo glicolítico e oxidativo (Lieber, 2002; Macintosh et al., 2006; Schiaffino, 2010). Por fim, as fibras musculares do tipo IIx apresentam propriedades intermediárias às das fibras do tipo IIa e IIb (Schiaffino, 2010).

O músculo esquelético tem a habilidade de se adaptar a diferentes estímulos (Karagounis, Hawley, 2010; Lebrasseur et al., 2011; Pette, Staron, 2000; Zanou, Gailly, 2013). Em situações de imobilização e períodos de repouso prolongados, em que ocorre ausência ou diminuição da mobilidade muscular, o músculo esquelético sofre redução da área de secção transversal (AST) das fibras musculares e consequentemente diminuição da força muscular, caracterizando atrofia muscular (Cassano et al., 2009; Jackman, Kandarian, 2004; Lieber, 2002; Murphy et al.,

2011a). Situações que requerem maior atividade do músculo esquelético, como por exemplo, treinamento de força (Matsakas, Patel, 2009; Schoenfeld, 2010) ou remoção de músculos sinergistas (Pehme et al., 2004), acarretam aumento da AST das fibras musculares e consequentemente aumento da força muscular, caracterizando hipertrofia muscular (Matsakas, Patel, 2009; Schoenfeld, 2010). Outra adaptação do músculo esquelético é a conversão gradual dos tipos de fibras musculares (Harridge, 2007; Pette, 2001). Estímulos como o treinamento aeróbico fazem com que as fibras musculares do tipo IIb iniciem uma conversão gradual em direção às fibras do tipo I; e a ausência de estímulos como imobilização do músculo esquelético, faz com que as fibras musculares do tipo I iniciem conversão gradual em direção às fibras do tipo IIb (Tiidus, 2008). Após estímulo lesivo, o músculo esquelético apresenta uma marcante habilidade de se regenerar, proporcionando a recuperação de sua estrutura e função (Zanou, Gailly, 2013).

1.2 Regeneração do músculo esquelético

O processo de regeneração do músculo esquelético ocorre após um estímulo lesivo que pode ser de causa: química, como toxinas (Salvini et al., 2001); mecânica, como no caso de traumas durante a prática esportiva que geram distensões e lacerações ou certos tipos de contrações, como a excêntrica, durante a atividade física (Järvinen, 2005; Ryall et al., 2010); e térmica, como a exposição do músculo esquelético à altas temperaturas o que pode causar queimadura (Sugita et al., 2011) ou à baixas temperaturas o que pode causar congelamento (Miyabara et al., 2010).

O processo de reparo após lesão consiste principalmente da inflamação, regeneração da fibra muscular, angiogênese e remodelamento muscular (Tidball, 2005; Zanou, Gailly, 2013). Após um estímulo lesivo ocorre ruptura do sarcolema da fibra muscular, aumento da permeabilidade celular (Charge, Rudnicki, 2004; Grefte et al., 2007; Järvinen et al., 2005) e aumento dos níveis séricos de algumas proteínas, como a creatina kinase, que frequentemente estão restritas no citoplasma (Charge, Rudnicki, 2004). A mudança na permeabilidade do sarcolema acarreta em aumento do influxo de cálcio para o meio intracelular e desencadeia proteólise cálcio-dependente, caracterizada pela necrose das fibras musculares lesadas (Ciciliot, Schiaffino, 2010; Grefte et al., 2007; Loell, Lundberg, 2011). A proteólise cálcio-dependente é decorrente da ativação das calpaínas, que são proteases

responsáveis por clivar a fibra muscular e proteínas citoesqueléticas (Belcastro et al., 1998; Kwak et al., 1993). A regulação da atividade das calpaínas depende de fatores como concentração de cálcio, fosforilação enzimática ou níveis de calpastatina, um regulador negativo de calpaína (Costelli et al., 2005).

Os vasos sanguíneos localizados ao longo das fibras musculares também são lesados o que possibilita a migração de células inflamatórias para o local da lesão das fibras musculares (Grefte et al., 2007; Järvinen et al., 2005). As principais células inflamatórias que invadem o local da lesão são neutrófilos e macrófagos (Järvinen et al., 2007). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegar ao local da lesão (Tiidus, 2008), com significativo aumento em seu número nas primeiras 6 horas após lesão por miotoxina ou exercício (Fielding et al., 1993; Orimo et al., 1991). Estas células são responsáveis por secretar radicais livres e citocinas pró-inflamatórias e, auxiliam na degradação de debris celulares (Carosio et al., 2011; Tidball, 2005). A quantidade de neutrófilos começa a declinar após 24 h e concomitantemente ocorre aumento gradual de macrófagos no sítio da lesão (Smith et al., 2008; Tiidus, 2008).

Geralmente, as populações de macrófagos apresentam atividades opostas, pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Arnold et al., 2007) de acordo com os diferentes estágios da regeneração (Kharraz et al., 2013; Wang et al., 2014). Os macrófagos são comumente classificados como M1 ou M2, referindo-se à sua ativação clássica ou alternativa, respectivamente (Mantovani et al., 2004; Wynn, Barron, 2010). Macrófagos M1 são induzidos por estímulo microbial, e/ou citocinas Th1, tais como interferon- γ (IFN- γ) ou *tumor necrosis factor* α (TNF α) (Mantovani et al., 2004; Saclier et al., 2013; Wang et al., 2014) e são usualmente encontrados em estágios precoces da regeneração. Os macrófagos M1 são responsáveis por fagocitar os debris celulares, além disso, expressam CD86 e secretam citocinas inflamatórias, tais como interleucina 1 β (IL-1 β) e *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), que é necessário para metabolizar L-arginase e promover uma reação fundamental para produzir grandes quantidades de óxido nítrico que participarão da eliminação de patógenos intracelulares (Kharraz et al., 2013; Locati et al., 2013, Mantovani et al., 2013). Adicionalmente, macrófagos M1 promovem a proliferação e reprimem a diferenciação de mioblastos e reduzem a produção de colágeno em cultura (Arnold et al., 2007; Cantini et al., 2002; Chazaud et al., 2003; Song et al., 2000; Tidball, 2005). Posteriormente, ocorre uma mudança no fenótipo dos

macrófagos M1 para M2. Os macrófagos M2 são constituídos de três subtipos (M2a, M2b, M2c), cada um com papel fisiológico distinto (Kharraz et al., 2013). Macrófagos M2a são oriundos da exposição às citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-13 (Bhattacharjee et al., 2013; Kharraz et al., 2013; Saclier et al., 2013; Stein et al., 1992), expressam altos níveis de fator de crescimento e transformação (*transforming growth factor*; TGF) β e arginase *in vitro* (Louis et al., 1999; Song et al., 2000) e estão associados a estágios avançados da regeneração muscular e cicatrização (Kharraz et al., 2013; Spencer et al., 2010; Vidal et al., 2008; Wehling-Henricks et al., 2010). Macrófagos M2b também possuem papel anti-inflamatório e são conhecidos por liberarem grandes quantidades de IL-10, porém estes, assim como os macrófagos M1, também podem liberar citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF α (Kharraz et al., 2013). Macrófagos M2c são ativados por IL-10 e também apresentam funções anti-inflamatórias (Kharraz et al., 2013).

A transição de macrófagos M1 presentes na fase aguda após lesão muscular (fase pró-inflamatória) para macrófagos M2 presentes na fase de diferenciação e fusão de mioblastos durante a regeneração muscular (fase anti-inflamatória) é crucial para este processo e é parcialmente regulada por *mitogen-activated protein kinase phosphatase-1* (MAPK-1) (Perdiguerro et al., 2012; Saclier et al., 2013). Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares responsáveis por promover a transição dessas fases durante a regeneração muscular ainda são pouco compreendidos. Sabe-se até o momento, que a mudança ocorre somente após a instalação da fase pró-inflamatória (Saclier et al., 2013) e que a ativação exacerbada da sinalização de M1 acarreta em déficit na regeneração muscular (Ruffell et al., 2009).

Algumas das citocinas liberadas por macrófagos, tais como TNF α e IL-6, são capazes de ativar as células satélites (Cantini et al., 1995; Chen et al., 2005; Li, 2003; Serrano et al., 2008; Szalay et al., 1997; Wang et al., 2008; Warren et al., 2002). As células satélites são células mononucleadas e indiferenciadas, que em condições basais encontram-se em estado quiescente e localizam-se entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular (Grounds, Yablonka-Reuveni, 1993; Muir et al., 1965; Schultz, McCormick, 1994). Entretanto, quando o músculo é submetido à estímulo lesivo, as células são ativadas e passam a ser denominadas células precursoras miogênicas ou mioblastos, as quais proliferam (Hawke, Garry, 2001; Wozniak et al., 2005). Posteriormente, tais células se diferenciam e ocorre então,

sua fusão à fibra muscular, contribuindo para a recomposição de fibras musculares lesadas (Hawke, Garry, 2001; Wozniak et al., 2005; Zanou, Gailly, 2013). O comportamento das células satélites depende de vários fatores, entre eles, o próprio nicho, a ação de células endoteliais e de progenitoras fibro-adipogênicas, o conteúdo de matriz extracelular e a inervação muscular (Joe et al., 2010; Murphy et al., 2011b; Zanou, Gailly, 2013). O estudo de Murphy et al. (2011b) mostrou que a inativação das células satélites resultou em completa perda da massa muscular em regeneração, assim como a desregulação de fibroblastos e aumento do tecido conjuntivo. Além disso, a ablação de fibroblastos alterou a atuação das células satélites, levando à diferenciação prematura, esgotamento de suas reservas e formação de fibras musculares regeneradas menores.

A regeneração muscular depende crucialmente da manutenção da lâmina basal (Ciciliot, Schiaffino, 2010). Dentro da lâmina basal as células satélites proliferam, diferenciam-se e fundem-se permitindo a reconstrução da fibra muscular em um curto período de tempo (Zanou, Gailly, 2013). O crescimento e o remodelamento muscular dependem do desenvolvimento dos vasos sanguíneos, da formação das conexões miotendíneas e da junção neuromuscular (Zanou, Gailly, 2013).

Como citado anteriormente a matriz extracelular tem um papel importante na regeneração muscular. A interação entre a matriz extracelular e as células de Schwann é essencial para a regeneração nervosa periférica e a presença de colágeno na matriz extracelular age como uma força motriz no crescimento e diferenciação do nervo (Liu, 1992). O remodelamento da matriz extracelular está envolvido no processo de regeneração muscular por meio da ativação de células satélites e da promoção da migração e fusão destas em miotubos. Tal mecanismo é influenciado por metaloproteinases, as quais permitem o *turnover* da matriz extracelular, por meio da clivagem de seus componentes e da ativação de fatores de crescimento (Lijnen et al., 1998; Saksela, Laiho, 1990).

Além das citocinas, vários fatores são responsáveis por ativar as células satélites, e desta forma, é importante ressaltar que o equilíbrio entre estímulos extrínsecos e sinais intracelulares convergem para preservar a função de tais células (Brack, Rando 2012). Dentre os fatores envolvidos na ativação das células satélites destacam-se: fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*, FGF); TGF; neurotransmissores; fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth*

factor, HGF); Wnt; Notch; óxido nítrico (NO) e fatores semelhantes à insulina I e II (*insulin-like growth factor-I* e *insulin-like growth factor-II*; IGF-I e IGF-II) (Carosio et al., 2011; Grefte et al., 2007; Kuang et al., 2008). O IGF-I, além de ativar as células satélites, promove a ativação da via de sinalização do complexo alvo da rapamicina em mamíferos 1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*; mTORC1) que é uma importante via responsável por induzir hipertrofia muscular por meio da ativação de síntese proteica (Ciciliot, Schiaffino, 2010). Além disso, o IGF-I também está envolvido na indução e modulação dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs) da família *helix-loop-helix*; ou seja, o fator de determinação miogênica (*myogenic determination factor*, Myo-D), o fator miogênico 5 (*myogenic factor 5*, Myf-5), a miogenina e o fator regulatório miogênico 4 (*myogenic regulatory factor 4*, MRF4); que participam de diversas etapas do processo regenerativo muscular (Carosio et al., 2011; Ciciliot, Schiaffino, 2010).

Quando ocorre lesão no músculo esquelético, a expressão de MRFs aumenta nas células satélites e sua ativação é controlada principalmente por fatores de transcrição Pax3, Pax7 e Myf5 (Grefte et al., 2007). As células satélites, quando ativadas, apresentam aumento nas expressões de MyoD e Myf5, acarretando na proliferação dessas células e aumento no número de células precursoras miogênicas no músculo (Ciciliot, Schiaffino, 2010; Grefte et al., 2007; Tiidus, 2008). A concomitante redução de Pax3 e Pax7 e o aumento da expressão dos fatores de transcrição miogenina e MRF4 proporcionam a diferenciação dos mioblastos durante o processo regenerativo do músculo (Grefte et al., 2007). A diferenciação terminal dos mioblastos é caracterizada pela fusão destes para formar miotubos que recompõem partes ou grandes extensões das fibras musculares previamente lesadas (Ciciliot, Schiaffino, 2010; Grefte et al., 2007; Tiidus, 2008). Dessa forma, a presença de fragmentações celulares e de fibras musculares com núcleos centralizados são sinais morfológicos característicos da regeneração muscular (Salvini et al., 1999; Wernig, 1991).

Como citado previamente, fatores de crescimento e transformação (TGF) também estão envolvidos na regeneração muscular. Tais fatores, como TGF- β e miostatina, ligam-se ao receptor activina tipo II (ActRII) localizado na membrana celular. O ActRII associa-se ao seu correspondente receptor activina tipo I (ActRI ou T β R-I), formando um complexo receptor heterotetramérico ativado, o qual transfosforila o T β R-I ativando a kinase latente deste complexo. O complexo do

receptor ativado fosforila as proteínas smad2 e smad3, que se unem à co-smad chamada smad4. O oligômero de smads transloca-se para o núcleo, onde interage com fatores que regulam a transcrição de genes-alvo (Chen et al., 2002; Zhu et al., 2004).

Membros da família TGF- β são moduladores da atividade de mioblastos, inibindo a proliferação e diferenciação destes (Greene, Allen, 1991; Lefaucheur, Seville, 1995; Lefaucheur et al., 1996) (Figura 1). O papel do TGF- β 1, β 2 e β 3 durante a regeneração muscular é complexo e envolve a regulação da fusão de mioblastos, a regulação da resposta imune e a sobrevivência do motoneurônio (McLennan, Koishi, 2002). Outro fator pertencente a essa via, é a miostatina, responsável por inibir o crescimento muscular via inibição de phosphoinositol 3-kinase (PI3K) e proteína kinase B (AKT) (PI3K/AKT) (Figura 1). Trabalhos têm demonstrado que a miostatina reprime a expressão gênica de MyoD, acarretando na atenuação da ativação e proliferação de células satélites durante a regeneração muscular (Marshall et al., 2008). Além disso, um estudo recente demonstrou que a expressão gênica de akirina1, uma proteína quimioatraente de macrófagos e importante para os processos de proliferação e diferenciação muscular, é reprimida por fatores de transcrição smad3 e smad4 (Salerno et al., 2009). Entretanto, os mecanismos intracelulares pelos quais a akirina1 modula o processo regenerativo muscular e a sua possível interação com elementos de vias controladoras do trofismo muscular ainda não são bem esclarecidos. De fato, o fator de crescimento epidermal (EGF), a miostatina e o TGF- β 1 parecem estar relacionados com a inibição do processo de regeneração muscular (Doumit et al., 1993; Fukushima et al., 2001; Langley et al., 2002; Li, Huard, 2002; Mendler et al., 2000; Rios et al., 2002; Taylor et al., 2001; Yamanouchi et al., 2000). Adicionalmente, estudos mostram que a miostatina regula o retorno das células satélites para o estado quiescente (McCroskery et al., 2003; McFarlane et al., 2008).

Figura 1 - Representação dos elementos da via de sinalização TGF β /ActRII/smads.

A transdução do sinal inicia-se com a interação do ligante no receptor activina tipo II. O receptor activina tipo II associa-se ao seu correspondente receptor activina tipo I, formando um complexo receptor heterotetramérico ativado, o qual transfosforila o receptor tipo I ativando a cinase latente deste complexo. O complexo do receptor ativado então fosforila a proteína smad2 e smad3 reguladas pelo receptor, que se unem à smad4. Esse conjunto de smads transloca-se para o núcleo e interage com fatores que regulam a transcrição de genes alvo da sinalização TGF- β . Além disso, a ativação dessa via acarreta na inibição de PI3K e AKT.

FONTE: Adaptado de Kollias e McDermontt (2008); Marimuthu et al. (2011); Osman et al. (2009); Salerno et al. (2009); Trendelenburg et al. (2009)

A sinalização β_2 -adrenérgica também tem sido descrita como uma importante moduladora do processo regenerativo muscular, portanto cabe uma introdução mais detalhada sobre a ação dos adrenoreceptores β_2 no músculo esquelético.

1.3 Adrenoreceptores β_2 no músculo esquelético

O sistema nervoso simpático é compreendido por duas principais moléculas químicas sinalizadoras, a adrenalina (epinefrina) e a noradrenalina (noraepinefrina). A noradrenalina é produzida e liberada pelos terminais nervosos e pela medula suprarrenal, a adrenalina por sua vez, é produzida e liberada pela medula suprarrenal (Guyton, Hall 2010). A ligação de uma dessas moléculas ao receptor adrenérgico promove uma determinada resposta de acordo com o subtipo do receptor (Lynch, Ryall, 2008). Os adrenoreceptores foram inicialmente divididos em dois grupos: alfa (α) e beta (β) (Ahlquist, 1948). Entretanto, esse sistema é bem mais

complexo e, sabe-se que existem pelo menos nove subtipos de adrenoreceptores (6 subtipos α : α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} ; 3 subtipos β : β_1 , β_2 e β_3), os quais estão localizados em diferentes proporções nos diversos tecidos do organismo (Dunser, Hasibeder, 2009; Lynch, Ryall, 2008).

Os adrenoreceptores possuem 7 domínios transmembrânicos e são membros da família de receptores acoplados à proteína G (*guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor*, família de GPCR), a qual é composta por 3 subunidades ($G\alpha$, $G\beta$, e $G\gamma$) (Dunser, Hasibeder, 2009; Leineweber, Heusch, 2009; Lynch, 2011; Lynch, Ryall, 2008). As subunidades α , β e γ da proteína G encontram-se ligadas à região intracelular da membrana plasmática formando a proteína heterotrimérica $G\alpha\beta\gamma$ (Lynch, 2011; Lynch, Ryall, 2008) (Figura 2). A ativação do adrenoreceptor β_2 ocorre por meio da ligação de um agonista ao receptor causando mudança conformacional em sua região intracelular e expondo seus sítios de ligação à proteína G, permitindo que esta se associe à sua terceira alça intracelular. Tal associação resulta na substituição do GDP ligado à $G\alpha$ por um GTP, e consequentemente desencadeia a dissociação da subunidade $G\alpha$ (ligada ao GTP) e a formação do dímero $G\beta\gamma$ (Lynch, 2011; Lynch, Ryall, 2008) (Figura 3). A partir disso, $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$ podem ativar diferentes cascatas de sinalização.

Figura 2 - Representação dos elementos da via de sinalização β_2 -adrenérgica localizados no sarcolema.

Adrenoreceptor β_2 com sete domínios transmembrânicos, uma terminação NH_2 extracelular e uma terminação $COOH$ intracelular; proteína G representada por suas subunidades α , β , γ localizada na porção intracelular do sarcolema; enzima transmembrânica adenilil ciclase (AC) com dois domínios hidrofóbicos transmembrânicos e dois domínios catalíticos citoplasmáticos.

FONTE: Adaptado de Lynch e Ryall (2008)

A subunidade $G\alpha$ pode ser dividida em 4 famílias principais: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ e $G\alpha_{12}$. Os adrenoreceptores β acoplam-se predominantemente a $G\alpha_s$ e a $G\alpha_i$, as quais estão envolvidas na ativação e na inibição da adenilil ciclase (AC), respectivamente (Lynch, 2011; Lynch, Ryall, 2008). A AC é uma enzima transmembrânica cuja função

é converter ATP em adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que por sua vez ativa várias moléculas efetoras, entre elas, a proteína kinase A (PKA), que está envolvida em processos como regulação do ciclo celular, proliferação e diferenciação celular e regulação dos mecanismos de transporte intracelular (Tasken, Aandahl, 2004). Adicionalmente, as subunidades catalíticas da PKA são capazes de fosforilar a proteína calpastatina, tornando-a ativa e acarretando na redução da ação proteolítica das enzimas calpaínas, μ -calpaína e m-calpaína, uma vez que calpastatina é o principal inibidor endógeno destas enzimas (Navegantes et al., 2001; Reiken et al., 2003). A inibição das calpaínas por meio da fosforilação da calpastatina pode atenuar a proteólise dependente de cálcio, regulando assim, o catabolismo proteico (Navegantes et al., 2001; Tidball, Spencer, 2000, 2002) (Figura 3).

O AMPc também ativa a proteína de troca diretamente ativada por AMPc (exchange protein directly activated by cAMP, EPAC) responsável por ativar a proteína Rap1, sendo estas duas proteínas relacionadas ao aumento de síntese proteica (Lynch, Ryall, 2008), acarretando em hipertrofia muscular esquelética (Hinkle et al., 2002; Navegantes et al., 2002) (Figura 3).

Figura 3 - Representação da via de sinalização β_2 -adrenérgica clássica: $G\alpha_s$ -AC-AMPc.

A ativação do adrenoceptor β_2 ocorre por meio da ligação do agonista no sítio de ligação do receptor resultando na associação da subunidade α da proteína G no sítio de fosforilação do receptor. Essa associação deve-se à substituição de GDP por GTP da proteína $G\alpha$ o que acarreta em mudança conformacional da estrutura heterotrimérica desta proteína, desencadeando a cascata de sinalização representada. Após associação ocorre ativação da adenilil ciclase que converte ATP em AMPc, e este ativa a proteína kinase A (PKA), proteína que está envolvida na redução da proteólise muscular. O AMPc também ativa a proteína de troca diretamente ativada por AMPc (*exchange protein directly activated by cAMP*, EPAC) responsável por ativar a proteína Rap1, sendo estas duas proteínas relacionadas ao aumento de síntese proteica.

FONTE: Adaptado de Lynch e Ryall (2008)

Como citado anteriormente, o dímero $G\beta\gamma$ também é capaz de ativar vias de sinalização independentes do AMPc, como é o caso da via PI3K/AKT, uma importante reguladora do trofismo muscular (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001) (Figura 4). Foram descritas três diferentes isoformas de AKT, sendo AKT1 a isoforma predominante no músculo esquelético (Nader et al., 2005).

Uma vez ativada por $G\beta\gamma$, a PI3K é capaz de fosforilar PIP2 (*phospholipid phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*), gerar PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) e criar sítios de ligação para a serina/treonina kinase AKT e para PDK (3'-*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) na membrana celular e em seguida PDK fosforila AKT (Lopez-Illasaca et al., 1997) (Figura 4).

Diversas vias dependentes de AKT são ativadas no músculo esquelético após a estimulação β_2 -adrenérgica, acarretando predominantemente hipertrofia muscular (Lynch, 2011; Lynch, Ryall, 2008). O estudo de Kline et al. (2007) demonstrou que a estimulação β_2 -adrenérgica resulta na fosforilação de AKT e subsequente ativação de mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Após ativação de mTOR ocorre a associação desta à raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) e $G\beta_L$ (*G protein β -subunit-like protein*) formando o complexo mTORC1 (mTOR-raptor- $G\beta_L$), cujos alvos são S6K (70 kDa ribosomal protein S6 kinase) e 4EBP1 (*eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1*) (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001). A formação do complexo mTORC1 induz tradução por meio da fosforilação do polipeptídeo ribossômico S6K (Bolster et al., 2004; Hara et al., 1998) e por meio da fosforilação inibitória do 4EBP1 (regulador negativo do fator de iniciação da tradução eIF4E; *eukaryotic initiation factor 4E*) (Hara et al., 1997) (Figura 4).

Outros fatores envolvidos no trofismo muscular são influenciados por AKT, como por exemplo, glicogênio sintase quinase 3β (GSK3 β) (Bodine et al., 2001) e fator de transcrição *forkhead box O* (FOXO) (Furuyama et al., 2002). O GSK3 β normalmente atua inibindo a tradução do fator de iniciação eucariótica 2B (eIF2B) e

quando AKT o inativa, ocorre síntese proteica (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001). AKT também favorece a síntese proteica por meio da inibição de FOXO, um fator de transcrição envolvido na ativação de genes indutores da degradação proteica, mais especificamente atrogina-1 e muRF-1 (muscle *ring finger-1*) que são enzimas (ubiquitina-ligases) envolvidas na principal via proteolítica do músculo esquelético, a via ubiquitina-proteassomo (Gomes et al., 2001; Lecker et al., 2004) (Figura 4).

Figura 4 - Representação da via de sinalização não clássica β_2 -adrenérgica: PI3K/AKT/mTOR.

O dímero Gβγ pode ativar PI3K que fosforila a PIP2 ligada à membrana plasmática e gera PIP3, criando sítios de ligação na membrana celular para a serina/treonina quinase AKT e para PDK. PDK fosforila AKT que resulta na ativação de mTOR que se associa à raptor e GβL formando o complexo mTORC1. S6K e 4EBP1 são alvos de mTORC1, a ativação de S6K e a inibição de 4EBP1 culmina no aumento de síntese proteica. AKT também atua inativando o fator glicogênio sintase quinase 3β (glycogen synthase kinase 3β, GSK3β) que acarreta na expressão do fator de iniciação eucariótico eIF2B favorecendo a síntese proteica. AKT fosforila o fator de transcrição forkhead box O (FOXO), o que inibe a ação deste na ativação de genes envolvidos na degradação proteica como muRF1 e atrogina-1.

FONTE: Adaptado de Lynch e Ryall (2008)

A atividade nervosa simpática no músculo esquelético é desencadeada por receptores beta adrenérgicos localizados no sarcolema das fibras musculares (Peters et al., 1998), sendo que o subtipo β_2 corresponde a cerca de 90% dos receptores β -adrenérgicos presentes no músculo esquelético (Elfellah et al., 1989).

Além do subtipo β_2 , também é possível encontrar no músculo esquelético cerca de 7-10% de receptores adrenérgicos do subtipo β_1 , (Kim et al., 1991; Williams et al., 1984).

A densidade dos receptores β -adrenérgicos difere nos diferentes tipos de fibra muscular, sendo que as fibras do tipo I apresentam duas a três vezes maior densidade de receptores β -adrenérgicos comparadas às fibras do tipo II (Kim et al., 1991; Ryall et al., 2004). Entretanto, a resposta à estimulação por meio de agonistas β -adrenérgicos é maior nas fibras musculares do tipo II (Ryall et al., 2002, 2006).

O papel do adrenoceptor β_2 na musculatura esquelética tem sido estudado por meio da administração de agonistas sintéticos (Beitzel et al., 2007; Conte et al., 2012; Harcourt et al., 2007; Kline et al., 2007; Ryall, Lynch, 2008; Ryall et al., 2006, 2007, 2008b). Estudos realizados com a administração de agonistas β_2 -adrenérgicos no músculo esquelético descrevem seu importante papel em diversas condições, entre elas: perda de massa e força muscular devido ao envelhecimento (Ryall et al., 2004, 2007), caquexia associada ao câncer e à AIDS (Fuster et al., 2007; Kenley et al., 2008), distrofia muscular (Gehrig et al., 2010), sepse, desuso, denervação, falência renal crônica, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica, entre outras (Ryall et al., 2008a). Em muitas destas condições, os agonistas β_2 -adrenérgicos são capazes de atenuar ou potencialmente reverter a atrofia e consequente fraqueza muscular (Lynch, Ryall, 2008), possivelmente por meio de mecanismos dependentes e independentes de AMPc anteriormente descritos. A estimulação β_2 -adrenérgica parece ter importante papel no controle da massa muscular, tanto devido à sua eficácia na promoção da síntese proteica, quanto na redução da degradação proteica (Baviera et al., 2010; Kline et al., 2007; Lopez-Illasca et al., 1997; Murga et al., 2000; Sneddon et al., 2001). Além do efeito anabólico, os agonistas β_2 -adrenérgicos também têm efeito lipolítico (Kim et al., 2010; Louis et al., 2000; Lynch, Ryall, 2008) e são capazes de promover a conversão gradual de fibras musculares do tipo I em direção às fibras do tipo II (Ryall et al., 2002, 2008).

O efeito dos agonistas β_2 -adrenérgicos na regeneração muscular esquelética também tem sido alvo de investigação, estudos relatam que uso do agonista β_2 -adrenérgico clenbuterol em músculos transplantados é capaz de antecipar a proliferação de células satélites quando comparado aos músculos apenas

transplantados (Roberts, Mcgeachie, 1992). Além disso, agonistas β -adrenérgicos seletivos e não seletivos para a isoforma β_2 , também são responsáveis por induzir aumento do conteúdo proteico e do diâmetro das fibras musculares em regeneração e consequentemente melhora funcional (Ryall et al., 2008b). Estudos que abordaram a regeneração muscular em animais idosos também demonstraram que a administração de agonistas β_2 -adrenérgicos reduz o processo inflamatório e a quantidade de tecido conjuntivo intramuscular, além de aumentar a síntese proteica e a força contrátil (Beitzel et al., 2004; Conte et al., 2012). Embora os agonistas β_2 -adrenérgicos proporcionem melhora estrutural e funcional do músculo esquelético em regeneração, os mecanismos intracelulares envolvidos nesses efeitos não são totalmente conhecidos.

Apesar dos trabalhos demonstrarem efeito benéfico de agonistas β_2 -adrenérgicos na regeneração muscular, o papel do adrenoceptor β_2 no processo regenerativo muscular ainda não é conhecido. Neste sentido, a utilização de animais *knockout* para o adrenoceptor β_2 representa uma excelente ferramenta para se estudar o papel deste receptor nos aspectos histológicos, moleculares e funcionais nas diferentes fases da regeneração muscular.

1.4 Justificativa e relevância do estudo

Este estudo propôs-se a contribuir para o melhor entendimento dos aspectos moleculares e funcionais envolvidos no processo regenerativo do músculo esquelético através do estudo do papel do adrenoceptor β_2 nesse processo. Neste contexto, a melhor compreensão da sinalização β_2 -adrenérgica no músculo esquelético em regeneração poderá servir de base para a identificação de novos alvos terapêuticos e para o desenvolvimento de novas estratégias na prevenção e no tratamento de lesões e outras disfunções músculo-esqueléticas.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo geral contribuir para o melhor entendimento do processo regenerativo muscular esquelético por meio do estudo do papel do adrenoceptor β_2 na regeneração de músculos esqueléticos utilizando camundongos *knockout* para este. Dessa forma, os objetivos específicos englobaram:

2.1 Objetivo 1

Avaliar o papel do adrenoceptor β_2 na morfologia do tecido muscular durante a regeneração

2.2 Objetivo 2

Avaliar o papel do adrenoceptor β_2 na atuação de macrófagos M1 e M2 durante a regeneração muscular.

2.3 Objetivo 3

Avaliar o perfil de ativação de elementos da via TGF- β /ActRII/smad na ausência do adrenoceptor β_2 durante a regeneração de músculos esqueléticos.

2.4 Objetivo 4

Avaliar o papel do adrenoceptor β_2 na função contrátil de músculos em regeneração.

3 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

A estratégia experimental consistiu em avaliar o papel do adrenoceptor β_2 na regeneração muscular nos períodos de 1, 3, 10 e 21 dias após a realização da criolesão no músculo *tibialis anterior* (TA) de camundongos *knockout* para o adrenoceptor β_2 e de camundongos selvagens. O músculo TA possui predomínio de fibras musculares do tipo II, portanto sua resposta frente à estimulação β_2 -adrenérgica é maior do que em músculos com predomínio de fibras do tipo I (Ryall et al., 2002, 2006). Após lesão, os músculos foram submetidos à análise macroscópica (peso corporal e muscular), histológica (coloração de azul de toluidina e *picrossirius red*), imuno-histoquímica (detecção de macrófagos, ativação do receptor T β R-I e de smad2/3), molecular (reação em cadeia da polimerase – expressão gênica de citocinas liberadas por macrófagos M1 e M2, western blot para elementos da via TGF β /ActRII/smud, mensuração do conteúdo de AMPc tecidual), celular (citometria de fluxo para determinar a porcentagem de macrófagos M1 e M2) e funcional (análise da contração tetânica e da fadiga muscular).

3.1 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo 1

O papel do adrenoceptor β_2 na morfologia do tecido muscular durante a regeneração foi avaliado por meio da análise histoquímica com azul de toluidina em 1, 3, 10 e 21 dias após lesão, coloração com *picrossirius red* em 10 e 21 dias após lesão.

3.2 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo 2

A avaliação do papel do adrenoceptor β_2 na atuação de macrófagos M1 e M2 durante a regeneração muscular foi realizada por meio da análise imuno-histoquímica para a detecção de macrófagos em 3 e 10 dias após lesão, reação em cadeia da polimerase para determinar a expressão gênica das citocinas iNOS, IL-1 β , Arginase-1 e Fizz-1 em 1, 3 e 10 dias após lesão e citometria de fluxo para determinar a porcentagem de macrófagos M1 e M2 em 3 e 10 dias após lesão.

3.3 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo 3

A avaliação do perfil de ativação de elementos da via TGF- β /ActRII/smad na ausência do adrenoceptor β_2 durante a regeneração de músculos esqueléticos foi realizada por meio da imunodeteção do receptor T β R-I e de smad2/3 ativados e de western blot para determinar a expressão de smad4 e akirina1 nos períodos de 3 e 10 dias após lesão.

3.4 Estratégias utilizadas para alcançar o objetivo 4

A avaliação do papel do adrenoceptor β_2 na função contrátil de músculos em regeneração foi realizada por meio da análise da contração tetânica máxima e da fadiga dos músculos em regeneração no período de 10 dias após lesão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos *knockout* para o adrenoceptor β_2 (β_2 KO) (Chruscinski et al., 1999) e camundongos machos selvagens (FVB - *Friend Leukemia Virus, strain B*), ambos com idade de 2 meses e peso aproximado de 25-32 g, mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os camundongos β_2 KO foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Patrícia C. Brum da EEFE (Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo) e foram submetidos à confirmação da deleção do gene do adrenoceptor β_2 por meio de genotipagem. Todos os animais foram mantidos em gaiolas contendo maravalha, água e ração *ad libitum*, com regime claro/escuro de 12h/12h.

Todos os protocolos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP número 107/11.

4.2 Grupos experimentais

Em todos os grupos experimentais foram avaliados diferentes períodos de regeneração muscular.

O papel do adrenoceptor β_2 na regeneração foi avaliado utilizando-se camundongos *knockout* para este e camundongos selvagens. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=6 cada) a seguir, totalizando 8 grupos experimentais de músculos criolesados, além dos grupos de músculos controle não lesados β_2 KO e FVB (Tabela 1):

a) Grupo criolesado (1 dia): Os animais β_2 KO (1º grupo) e FVB (2º grupo) tiveram os músculos TA da pata esquerda criolesados e analisados após 1 dia. Os músculos da pata contralateral serviram de controle intacto.

b) Grupo criolesado (3 dias): Os animais β_2 KO (3º grupo) e FVB (4º grupo) tiveram os músculos TA da pata esquerda criolesados e analisados após 3 dias. Os músculos da pata contralateral serviram de controle intacto.

c) Grupo criolesado (10 dias): Os animais β_2 KO (5º grupo) e FVB (6º grupo) tiveram os músculos TA da pata esquerda criolesados e analisados após 10 dias. Os músculos da pata contralateral serviram de controle intacto.

d) Grupo criolesado (21 dias): Os animais β_2 KO (7º grupo) e FVB (8º grupo) tiveram os músculos TA da pata esquerda criolesados e analisados após 21 dias. Os músculos da pata contralateral serviram de controle intacto.

Tabela 1- Grupos experimentais dos camundongos β_2 KO e FVB.

β_2 KO					FVB				
C	Crio				C	Crio			
	1 dia	3 dias	10 dias	21 dias		1 dia	3 dias	10 dias	21 dias

Organização dos grupos experimentais dos camundongos β_2 KO e FVB. β_2 KO: animais *knockout* para o adrenoceptor β_2 ; FVB: animais selvagens; C: controle; Crio: animais criolesados; 1 dia, 3 dias, 10 dias, 21 dias: período que os animais foram analisados após a criolesão.

4.3 Genotipagem

No intuito de confirmar a deleção do gene do adrenoceptor β_2 nos animais knockout foi realizada a reação em cadeia da polimerase. Amostras da cauda dos animais FVB e β_2 KO foram coletadas, o DNA genômico dessas amostras foi extraído por meio de NaOH 50 mM aquecido a 95 °C por 20 min. Após digestão da cauda, Tris 1 M (pH 7,4) foi adicionado no intuito de neutralizar o processo de extração. O DNA genômico foi submetido à reação em cadeia da polimerase para verificação da deleção do gene do adrenoceptor β_2 . A sequência dos primers utilizados (Tabela 2) foram sintetizados pela Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

Tabela 2 - Sequência de primers utilizados.

Primer	Forward	Reverse
Beta 2 Selvagem	CGAGTGGTCATCCTGATG	GCAGAACTTGAGGACC
Beta 2 Neo		TCCATCATGGCTGATGCAAT

As amostras de DNA genômico obtidas dos animais FVB e animais β_2 KO foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) em um termociclador. O PCR foi conduzido com volume final da reação de 25 μ l. Para tanto, foram utilizados 2 μ g de DNA genômico, primers Forward e Reverse para o gene de interesse (0,5

umol/ul cada) e água ultra pura (22 µl; Amresco, Solon, OH, EUA). O kit ilustraTM (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido) foi utilizado, contendo DNA polimerase e outros componentes necessários para a reação de amplificação. Cada amostra foi submetida à um ciclo de 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 61 °C por 60 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e, finalmente um ciclo de 72 °C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose diluído em tampão Tris-EDTA 1x na concentração de 1,8%. A presença das bandas foi verificada por meio de um transiluminador, sendo que a amplificação do gene do adrenoceptor β_2 no animal FVB corresponde a 350 pares de bases (pb) e a amplificação do gene contendo a interposição do cassete de neomicina corresponde a 1350 pb (Figura 5).

Figura 5 - Representação da expressão do gene do adrenoceptor β_2 contendo a interposição do cassete de neomicina no músculo esquelético do camundongo β_2 KO.

1) marcador de peso molecular; 2) controle negativo contendo apenas os primers Beta 2 FVB forward e reverse; 3) controle negativo contendo apenas os primers Beta 2 FVB forward e Beta 2 neo reverse; 4) amostra de animal FVB contendo primers Beta 2 FVB forward e reverse (banda 350 pb); 5) amostra de animal FVB contendo primers Beta 2 FVB forward e Beta 2 neo reverse; 6) amostra de animal β_2 KO contendo primers Beta 2 FVB forward e reverse; 7) amostra de animal β_2 KO contendo primers Beta 2 FVB forward e Beta 2 neo reverse (banda 1350 pb).

4.4 Protocolo de criolesão

Os camundongos foram anestesiados com ketamina e xilazina (intraperitoneal) (30 e 10 mg/kg, respectivamente) e o músculo TA foi cirurgicamente exposto. A criolesão consistiu de um ciclo de congelamento e descongelamento muscular. O congelamento foi realizado através da aplicação de uma barra de ferro (2 x 9 mm), previamente imersa em nitrogênio líquido, sobre toda a superfície do músculo durante 10 s. Após o descongelamento dos músculos, a pele foi suturada e os animais foram mantidos em placa aquecida (37 °C) no intuito de prevenir hipotermia (Conte et al., 2012).

4.5 Histologia

Após os períodos de 1, 3, 10 e 21 dias de criolesão de acordo com cada grupo experimental, os camundongos foram pesados, eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram seus músculos TA removidos, pesados e congelados. Cada músculo foi dividido em duas partes semelhantes por meio de um corte transversal no ventre muscular. Uma metade de cada músculo foi destinada à histologia, sendo assim, foi pré-congelada em isopentano (10 segundos) e rapidamente imersa em nitrogênio líquido. A outra metade foi cortada e congelada diretamente em nitrogênio líquido para a determinação da expressão de proteínas, expressão gênica e conteúdo de AMPc tecidual.

Cortes transversais não seriados (10 µm de espessura) foram obtidos da região média dos músculos destinados à histologia utilizando-se um criostato (Leica, Wetzlar, Alemanha), mantido à temperatura de - 25 °C. As secções musculares foram coradas com azul de toluidina para análise da morfologia geral (Morini et al., 1998) e *picrossirius red* para visualização do tecido conjuntivo (coloração em vermelho). Além disso, as fibras necrosadas foram localizadas por meio da detecção histoquímica da atividade da fosfatase ácida lisossomal (*Gomori lead method*) (Bancroft, 1996; Miyabara et al., 2010).

4.6 Mensuração do conteúdo de AMP_c tecidual

A quantificação de AMP_c foi realizada conforme descrito por Conte et al. (2012). Os músculos foram homogeneizados a 4 °C em 1 ml de ácido tricloroacético 5% (TCA; 0,06 g/ml), em seguida, foram centrifugados a 1500 g durante 10 minutos e a fração sobrenadante foi separada e extraída três vezes com 5 ml de éter etílico saturado com água. A fase éter foi descartada e a fase aquosa foi aquecida a 80 °C para a remoção de todos os resquícios de éter. A quantidade de AMP_c foi determinada através do método ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando-se um kit comercial (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EUA) (Silvina Lo Presti et al., 2008).

4.7 Análise imuno-histoquímica

As secções transversais dos músculos destinados à imuno-histoquímica foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% em 0,2 M de PB (*phosphate buffer*) por 10 min a temperatura ambiente, bloqueadas com 0,1 M de glicina em PBS (*phosphate buffer saline*) por 5 min e permeabilizadas em 0,2% de triton em X-100/PBS por 10 min. As lâminas foram incubadas com uma solução contendo o anticorpo primário, 3% de *normal goat serum* e 0,3% de triton X-100/0,1 M PB *overnight* em recipiente úmido (4 °C). Após a lavagem com 0,1 M PB (3 vezes de 10 min cada), a solução contendo o anticorpo secundário e 0,3% de triton X-100/0,1 M PB foi adicionada por 2 horas em sala escura. As lâminas foram lavadas em 0,1 M PB (3 vezes de 10 min cada) e cobertas com lamínulas utilizando-se a resina *Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI* (H-1200, Vector Labs) (Pereira et al., 2014).

4.7.1 Anticorpos para imuno-histoquímica

Os anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica foram: 1) *mouse monoclonal to macrophages* (MAC387, cat# ab22506; 1:200; Abcam, Cambridge, MA, EUA), 2) *rabbit polyclonal anti-TGF- β receptor I phospho S165* (cat# ab112095, 1:250; Abcam), e 3) *rabbit monoclonal anti-smad2/3* (cat# 8685; 1:200; Cell Signaling

Technology, Danvers, MA, EUA). Os correspondentes anticorpos secundário foram: 1) goat anti-mouse IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:200; cat# 115-095-166; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Baltimore, PA, EUA); 2) e 3) goat anti-rabbit IgG-rhodamine (1:200; cat# ab6718; Abcam).

4.8 Análise quantitativa e morfométrica

A análise da AST das fibras musculares foi feita em cinco áreas por campo nos músculos dos animais controles, e nos animais criolesados (10 e 21 dias após criolesão), a AST foi obtida somente das fibras musculares previamente lesadas (fibras musculares com núcleo centralizado). Além disso, a análise da AST contendo células inflamatórias foi realizada nos períodos de 3 e 10 dias após criolesão, sendo identificada como a porcentagem da área total do músculo. O número de fibras musculares em regeneração também foi mensurado nos períodos de 10 e 21 dias após criolesão e expresso como a porcentagem do número de fibras que apresentaram núcleo centralizado em relação ao número total de fibras musculares. O número de fibras necrosadas foi expresso como a porcentagem do total de fibras musculares em 1 dia após lesão.

O sistema de planimetria por contagem de pontos foi utilizado para a determinar a densidade do tecido conjuntivo pela marcação das 500 intersecções das linhas por campo (Mathieu et al., 1981). As intersecções que coincidiam no conjuntivo nas quatro áreas por secção selecionadas aleatoriamente de cinco secções transversais histológicas por animal foram marcadas, correspondendo ao total de 10.000 intersecções por músculo de cada animal. A área relativa do tecido conjuntivo (densidade de área) foi calculada pela divisão da soma do número de pontos coincidentes nas intersecções pelo total de pontos.

O número de macrófagos foi obtido nos períodos de 3 e 10 dias após criolesão de cinco campos aleatórios fotografados da área lesada dos músculos. As áreas desses cinco campos foram mensuradas e somadas. A quantidade de macrófagos foi expressa por meio da razão entre o número de macrófago e o volume (mm^3 de tecido muscular lesado); sendo que esse volume foi calculado realizando-se o produto entre a AST dos cinco campos e a espessura da secção do tecido muscular (10 μm) (Pizza et al., 2002).

A área positiva para T β R-I fosforilado e o número de núcleos positivos para smad2/3 foram obtidos da secção transversal total do músculo lesado e analisado após 3 dias de lesão. A área positiva para T β R-I fosforilado foi expressa como a porcentagem da área de secção transversal total e o número de núcleos positivos para smad2/3 foi expresso por milímetro quadrado (mm²).

As secções histológicas foram obtidas por meio de uma câmera acoplada em microscópio de luz Nikon Eclipse (PCM2000, Maine, NY, EUA) e as imagens digitais foram adquiridas utilizando o *software* Metamorph[®] (Universal Imaging Corporation). Para as secções transversais submetidas à imunodeteção foi utilizado um microscópio de fluorescência (Observer D1, Zeiss, Jena, Alemanha) equipado com filtros FITC, rodamina e fura e as imagens foram adquiridas por meio do *software* Zen (Zeiss, Jena, Alemanha).

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* Image Pro-Plus 4.5[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA). As figuras foram montadas no *software* Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, CA, USA).

4.9 Mensuração da expressão proteica

A técnica de Western blotting foi realizada para determinar a expressão de proteínas nos músculos dos grupos experimentais. Como previamente descrito por Conte et al. (2012), os músculos foram removidos imediatamente após o sacrifício do animal. As amostras de músculos foram homogeneizadas com tampão contendo 90 mM de KCl, 10 mM de HEPES (4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid), 3 mM de MgCl²⁺, 5 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 1% de glicerol, 1 mM ditioneitol (dithiothreitol, DTT), 0,04% dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate, SDS), inibidor de protease e coquetel inibidor de fosfatase (1:100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) utilizando um homogeneizador do tipo Polytron em máxima velocidade durante 10 segundos. Os extratos de tecido foram centrifugados a 12.000 g a 4 °C, por 40 minutos.

Após centrifugação, o sobrenadante das amostras foi coletado. O conteúdo proteico foi determinado pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) com albumina de soro bovino como referência. Quantidades iguais de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida por meio da eletroforese e transferidas para uma

membrana de nitrocelulose (Trans-Blot Semi-Dry, Bio-Rad). A membrana foi corada com Ponceau S para confirmar as quantidades iguais de proteínas carregadas no gel e transferidas para a membrana.

A membrana foi incubada com anticorpo primário overnight a 4 °C. Após 30 minutos de lavagem em tampão TBS-Tween (*Tween Tris-Buffered Saline*: 0,5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, e 0,1% Tween 20), a membrana foi incubada durante uma hora em temperatura ambiente com o correspondente anticorpo secundário conjugado a *peroxidase horseradish*, capaz de produzir uma reação de quimiluminescência (ECL; Amersham), que foi capturada em filme. Os sinais nos filmes foram digitalizados por scanner.

A análise da densitometria foi realizada conforme descrita por Pereira et al. (2014).

4.9.1 Anticorpos para western blot

Os anticorpos primários utilizados para western blot foram: 1) *rabbit polyclonal anti-smad4* (1:1000; cat# 9515; Cell Signaling Technology), 2) *rabbit polyclonal anti-akirin1* (1:1000; cat# ab77075; Abcam), e 3) *rabbit polyclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (1:2000; cat# ABS16; Millipore, Billerica, MA, EUA), usado como normalizador.

O anticorpo secundário usado para todos os experimentos de western blot foi a peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (1:10000; cat# 111-035-003; Jackson Immuno Research Laboratories Inc.).

4.10 Análise da expressão gênica

4.10.1 Transcrição reversa

O RNA total foi isolado das amostras musculares utilizando-se o reagente Trizol e seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Conforme descrito por Silva et al. (2012) foi utilizado 1 µg do RNA total na reação contendo oligo-dT (500 µg/ml), 10 mM cada dNTP, 5x first-strand buffer, 0,1 M DTT e 200 U de transcriptase reversa (SuperScript II; Invitrogen). A transcrição reversa foi realizada à 70 °C por 10 min, seguida de 42 °C por 60 min e 95 °C por 10 min.

4.10.2 Sequência de primers

As seguintes sequências de primers foram utilizadas: Fizz-1: 5'-GAGACCATAGAGATTATCGTGGA-3' forward, 5'-CACACCCAGTAGCAGTCATC-3' reverse; Arginase-1: 5'-CAATGAAGAGCTGGCTGGTGT-3' forward, 5'-GTGTGAGCATCCACCCAAATG-3' reverse; iNOS: 5'-CTGCAGCACTTGGATCAG-3' forward, 5'-CGTACCAGGCCCAATGAG-3' reverse; IL-1 β : 5'-CCAAAAGATGAAGGGCTGCTTCC-3' forward, 5'-GGATGGGCTCTTCTTCAAAGATG-3' reverse and TFIIID: 5'-TTAGGCCTGGAAAGGTGTTACG-3' forward, 5'-CCTCCAAACAGATGGAACATTCT-3' reverse.

A sequência dos primers para Fizz-1, Arginase-1 e iNOS foram obtidas de Villalta et al. (2011) e as sequências para IL-1 β e para o fator de transcrição IID (TFIID) foram obtidas de Acharyya et al. (2007) e Silva et al. (2012), respectivamente. Os primers foram sintetizados pela empresa Exxtend Biotecnologia Ltda (Paulínia, SP, Brazil).

4.10.3 PCR em tempo real

As amostras de cDNA obtidas foram submetidas ao PCR em tempo real. Para tanto, foi adicionado à cada amostra (0,60 ng/ μ l) um mix contendo o primer Forward e Reverse do gene de interesse (400 nM cada), Syber Green PCR Master mix (5 μ l; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), água ultra pura (2,2 μ l). Cada amostra foi submetida à 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos.

Todas as amostras foram analisada em duplicata e as reações foram quantificadas usando o *software ABI Prism 7300 Sequence detection system* (QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System; Applied Biosystems) com base em Aoki et al. (2009). A análise das amplificações foi realizada por meio do *software* da Applied Biosystems. Os resultados foram expressos como *comparative cycle threshold* (Ct) como descrito no User Bulletin No. 2 (Applied Biosystems). Em cada amostra, os valores Δ Ct foram calculados para cada gene de interesse da seguinte forma: Ct do gene de interesse - Ct do gene normalizador, fator de transcrição (TFIID). As alterações relativas dos níveis de expressão de um determinado gene

($\Delta\Delta Ct$) foram obtidas subtraindo o ΔCt dos músculos controle FVB (utilizado como um normalizador) dos correspondentes ΔCt s dos grupos tratados (crio FVB, controle $\beta_2 KO$, crio $\beta_2 KO$). Os valores foram determinados como: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo o $\Delta\Delta Ct$ e os níveis do controle definidos arbitrariamente como 1. O grupo FVB Crio 1 dia foi usado como controle quando a amplificação não foi detectada no grupo FVB controle.

4.11 Citometria de fluxo

Para a realização dos experimentos de citometria de fluxo, foram utilizados os músculos TA inteiros, portanto outros animais foram criados especificamente para este fim.

Baseado em Cheung et al. (2012), os músculos TA foram dissecados e triturados com tesoura, em seguida submetidos à dissociação enzimática com collagenase tipo II (500 unidades por mL; Invitrogen) em meio Ham's F10 contendo 10% HS (*horse serum*; Invitrogen) por 90 minutos. Posteriormente, fibras musculares fragmentadas foram lavadas e digeridas com collagenase tipo II (100 unidades por mL) e dispase (2 unidades por mL; Invitrogen) durante 30 minutos. A suspensão de fibras musculares digeridas foi triturada e lavada, resultando em uma suspensão de células mononucleares, que foram filtradas com *cell strainer* 40- μm (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). As células foram centrifugadas à 1000 rpm por 15 min e então ressuspensas em tampão de lise para remoção de eritrócitos (155 mM NH_4Cl , 10 mM $NaHCO_3$, 0,1 mM EDTA). O precipitado celular foi lavado em PBS com 2% de soro fetal bovino, ressuspendido em 1% *Fc Block reagent* (BD Biosciences) e incubado por 20 min à 4 °C no intuito de bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos. Em seguida, as células foram incubadas por 30 min à 4 °C no escuro com os seguintes anticorpos *APC-Cy7-conjugated antibody against CD11b*, *PE-conjugated antibody against CD86* (para validação da polarização M1), *APC-conjugated antibody against CD206* (para validação da polarização M2) na diluição de 1:100. Após subsequente lavagem as células foram fixadas com o reagente *Cytofix* (BD Biosciences) e reservadas para análise. Pelo menos 50.000 células foram adquiridas por meio do equipamento BD FACSCanto II usando o *software* FACSDiva (BD Biosciences). A análise dos dados foi realizada por meio do *software*

FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Um *gate* para detectar a população total de macrófagos foi montado com base em *forward scatter* (FSC) e células positivas para CD11b. Desta população total, foram criados os *gates* para as células positivas para CD86 e CD206. Os resultados foram apresentados como a porcentagem de células marcadas positivamente dentro da população total de macrófagos ou das populações dos subtipos de macrófagos (*gates* CD86 e CD206). Os resultados são representativos de três experimentos distintos.

4.12 Mensuração da função muscular

Para a realização dos experimentos de contração muscular, foram utilizados os músculos TA inteiros, portanto outros animais foram criados especificamente para este fim.

Os camundongos FVB e β_2 KO foram anestesiados com pentobarbital sódico (75 mg/kg de peso corporal). Uma incisão foi feita nos tornozelos de ambas as patas dos animais para se expor os tendões dos músculos TA. Em seguida, os animais foram colocados em uma plataforma e a pata foi estabilizada na plataforma com uma fita adesiva. O tendão foi amarrado com uma linha (4-0) conectada ao transdutor de força (BIOPAC Systems), responsável por captar e transmitir a força desenvolvida pelo músculo para o computador. A análise dos dados foi feita por meio do software Acqknowledge 3.9.1. A região de exposição do tendão foi mantida úmida com solução salina.

Os músculos TA foram ativados via nervo isquiático, que foi cuidadosamente isolado de outros músculos e conectado a um eletro-estimulador (BIOPAC Systems). O protocolo de estimulação utilizado foi adaptado de Chan e Head (2010) e Pereira et al. (2014). A duração de pulso de 0,2 ms foi utilizada para todas as contrações, a duração de trem de pulso de 3 ms e 300 ms foram utilizadas nas contrações isoladas e tetânicas, respectivamente. A voltagem foi iniciada em 2 V e ajustada por meio de incrementos de 1 V até que a tensão isolada máxima fosse atingida para a contração isolada, para a contração tetânica máxima foi utilizada a maior voltagem alcançada. O comprimento ótimo do músculo (L_0) TA foi determinado de modo a produzir a força tetânica máxima (Chan, Head, 2010). A estimulação da frequência foi de 2 Hz para as contrações isoladas e uma curva força-frequência foi obtida pela

análise da força máxima produzida nas frequências de 50, 100, 200 e 400 Hz, com dois minutos de repouso entre cada uma, verificou-se que a frequência de 200 Hz foi suficiente para obter contração tetânica máxima. A análise da força foi feita por meio da medida da força tetânica máxima, obtida em gramas e convertida em miliNewtons (P_0 , mN) e da força específica (razão entre P_0 e a AST do músculo; mN/mm^2).

O procedimento experimental consistiu do ajuste do L_0 e da voltagem, em seguida foi realizado 2 min de contrações isoladas, seguido de uma contração tetânica máxima (chamada de pré-fadiga) mais 2 min de contrações isoladas, 10 contrações tetânicas submáximas com o objetivo de causar fadiga muscular, 2 minutos de contrações isoladas e finalmente, a última contração tetânica máxima (chamada de contração pós-fadiga), como exemplificado no esquema da Figura 6.

Figura 6 - Esquema representativo do experimento de mensuração da função contrátil muscular nos camundongos FVB e $\beta_2\text{KO}$.

L_0 : comprimento ótimo do músculo; V : voltagem; P_0 Pré-fadiga: primeira contração tetânica máxima; 10 - P_0 : 10 contrações tetânicas submáximas; P_0 Pós-fadiga: segunda contração tetânica máxima.

4.13 Análise estatística

Os dados estão expressos como média e desvio padrão (DP). A análise de variância (ANOVA), seguida do *post-hoc* de Bonferroni (paramétrico), foi realizada para a comparação múltipla entre mais de dois grupos. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado no intuito de comparar as frequências de distribuição da AST das fibras musculares entre os grupos. O teste de modelos mistos para medidas repetidas (*Mixed Models to repeated measures*) foi utilizado no intuito de se analisar os dados de função muscular. Para comparação entre dois grupos, o teste t não pareado foi utilizado. O software de análise utilizado foi o SAS, versão 9.2 (SAS Institute Inc.; Cary, NC, EUA). As análises foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Peso corporal e peso muscular

O peso corporal dos animais do grupo FVB não alterou no decorrer dos 21 dias (Tabela 3). No grupo β_2 KO ocorreu aumento de 8% do peso corporal no período de 10 dias e aumento de 12% no período de 21 dias em relação ao peso corporal dos animais controle ($p \leq 0,05$; Tabela 3).

O peso muscular dos animais do grupo FVB criolesado e analisado 1 dia após lesão aumentou 47% comparado ao peso muscular do animal controle ($p \leq 0,05$; Tabela 3). Em 3 dias após criolesão houve diminuição de 47% do peso muscular nos animais do grupo FVB comparado com o peso muscular em 1 dia após criolesão ($p \leq 0,05$; Tabela 3). O peso muscular dos animais do grupo FVB analisados 10 dias após criolesão também diminuiu 26% comparado com o peso muscular do controle; comparado ao período de 1 e 3 dias após criolesão essa queda do peso foi de 49% e 29%, respectivamente ($p \leq 0,05$; Tabela 3). Em 21 dias após a criolesão, o peso muscular dos animais do grupo FVB diminuiu 32% comparado ao período de 1 dia após lesão ($p \leq 0,05$; Tabela 3) e aumentou 34% comparado ao período de 10 dias após lesão ($p \leq 0,05$; Tabela 3).

Os animais do grupo β_2 KO apresentaram aumento de 25% do peso muscular em 1 dia após criolesão comparado ao controle ($p \leq 0,05$; Tabela 3). Em 3, 10 e 21 dias após criolesão também houve redução de 27%, 28% e 19%, respectivamente, do peso muscular nos animais do grupo β_2 KO comparado ao período de 1 dia após criolesão ($p \leq 0,05$; Tabela 3). Além disso, no período de 1 dia após criolesão o peso muscular dos animais do grupo β_2 KO foi 13% menor do que o peso muscular dos animais do grupo FVB neste mesmo período ($p \leq 0,05$; Tabela 3). No período de 10 dias após criolesão o peso muscular dos animais do grupo β_2 KO foi 25% maior que o peso muscular dos animais do grupo FVB neste mesmo período ($p \leq 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação entre PC (g) e PM (mg) dos camundongos FVB e β_2 KO.

	Grupos	C	Crio 1 d	Crio 3 d	Crio 10 d	Crio 21 d
PC (g)	FVB	27,4 (1,3)	27,5 (1,3)	28,1 (0,8)	28,3 (1,4)	29,1 (1,4)
	β_2 KO	26,6 (1,2)	26,7 (1,2)	27,4 (1,2)	28,7 (1,8) [*]	29,8 (2,0) [*]
PM (mg)	FVB	36,6 (2,7)	53,8 (1,1) [*]	38,6 (3,2) ^a	27,2 (1,9) ^{*ab}	36,6 (1,3) ^{ac}
	β_2 KO	37,5 (4,4)	46,9 (2,5) ^{*#}	34,4 (3,9) ^a	34,0 (4,2) ^{a#}	38,2 (2,3) ^a

Valores são expressos como média e desvio padrão; $n = 6$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. PC: peso corporal (g); PM: peso muscular (mg). C: Animais analisados antes da criolesão; Crio 1 d, Crio 3 d, Crio 10 d e Crio 21 d: Animais criolesados e analisados após 1, 3, 10 e 21 dias, respectivamente. ^{*} $p \leq 0,05$ vs. respectivos controles; [#] $p \leq 0,05$ vs. grupo FVB avaliado no mesmo período; ^a $p \leq 0,05$ vs. Crio 1d; ^b $p \leq 0,05$ vs. Crio 3 d; ^c $p \leq 0,05$ vs. Crio 10d.

FONTE: Silva et al. (2014)

5.2 Histologia

Na análise histológica dos músculos dos grupos FVB e β_2 KO corados com azul de toluidina foi possível observar morfologia normal nos grupos controle, sendo que as fibras musculares apresentaram formato poligonal sem sinais de lesão (Figura 7A). Em 1 dia após criolesão, os músculos dos camundongos FVB e β_2 KO tiveram evidentes sinais de lesão, como confirmado pela presença de fibras hipercontraídas, infiltrado de células inflamatórias e espaços em branco entre as células, indicando necrose muscular, rompimento do tecido muscular e edema (Figura 7A). Adicionalmente, a porcentagem de fibras necrosadas no músculo analisado 1 dia após a criolesão foi similar nos dois grupos (43% no grupo FVB e 44% no grupo β_2 KO, Figura 7B).

Em 3 dias após lesão, os músculos dos grupos FVB e β_2 KO apresentaram pequena área inflamatória (18% e 25% da área de secção transversal total, respectivamente, Figura 7C), sendo que foi possível observar uma tendência a aumento nos músculos dos animais β_2 KO quando comparada àquela dos animais FVB (Figura 7C). Fibras hipercontraídas foram observadas nos músculos dos animais β_2 KO (Figura 7A), sugerindo a persistência de sinais agudos de lesão muscular.

Nos animais FVB criolesados e analisados após 10 dias, foi possível observar mínimo processo inflamatório, fibras dispostas de maneira organizada e com núcleo centralizado (Figura 7A). Entretanto, os músculos dos animais β_2 KO criolesados e

analisados após 10 dias ainda apresentaram sinais típicos de lesão aguda, tais como, fibras hipercontraídas e processo inflamatório intenso, o qual foi 254% maior comparado ao encontrado nos músculos lesados do animal FVB ($p \leq 0,05$; Figura 7C). Adicionalmente, a área de infiltrado inflamatório nos músculos dos animais β_2 KO analisados nesse período aumentou quando comparado com o período de 3 dias após lesão (47%, $p \leq 0,05$; Figura 7C). Todavia, não houve diferenças nos músculos dos animais FVB nos mesmos períodos analisados (Figura 7C).

Em 21 dias após criolesão, os músculos dos animais FVB e β_2 KO apresentaram fibras musculares com núcleo centralizado (Figura 7A), e detectou-se áreas claras arredondadas apenas nos músculos dos camundongos β_2 KO, sugerindo a presença de possíveis adipócitos (Figura 7A).

A porcentagem de fibras musculares em regeneração com núcleo centralizado não foi alterada em ambos os grupos FVB e β_2 KO nos períodos de 10 e 21 dias após lesão (Figura 7D).

Figura 7A - Imagem representativa da secção transversal de músculos dos animais FVB e β_2 KO corados com azul de toluidina.

C: Controle intacto do animal FVB e do animal β_2 KO; Crio 1 d: Músculo criolesado e analisado após 1 dia dos animais FVB e β_2 KO; Crio 3 d: Músculo criolesado e analisado após 3 dias dos animais FVB e β_2 KO; Crio 10 d: Músculo criolesado e analisado após 10 dias dos animais FVB e β_2 KO; Crio 21 d: Músculo criolesado e analisado após 21 dias dos animais FVB e β_2 KO. Em 1 dia após a lesão os animais do grupo FVB e do grupo β_2 KO apresentaram processo inflamatório (asteriscos; c,d) e fibras hipercontraídas (setas; c, d). Em 3 dias após a lesão os animais do grupo FVB e do grupo β_2 KO apresentaram processo inflamatório (asteriscos; e, f) e fibras hipercontraídas (setas; f). Em 10 dias após a lesão os animais do grupo FVB apresentaram células em regeneração com núcleo centralizado (cabeças de setas; g) e células em regeneração com diâmetro maior que os músculos dos animais do grupo β_2 KO (h). O músculo dos animais do grupo β_2 KO em 10 dias após criolesão ainda apresentam grande processo inflamatório (asteriscos; h) e fibras hipercontraídas (setas; h) e algumas células em regeneração com núcleo centralizado (cabeças de setas; h) Em 21 dias após criolesão animais FVB e β_2 KO apresentaram fibras musculares em regeneração com núcleo centralizado (cabeças de setas; i, j), área claras arredondadas presentes no grupo β_2 KO (sinal de mais; j) Barra: 50 μ m.

FONTE: Silva et al. (2014)

Figura 7B - Porcentagem de fibras musculares necrosadas no músculo dos animais FVB e β_2 KO analisados em 1 dia após a criolesão.

Valores são expressos como média e desvio padrão; $n = 3$. (test t não pareado).
 FONTE: Silva et al. (2014)

Figura 7C - Porcentagem da área com infiltrado inflamatório no músculos dos animais FVB e β_2 KO analisados em 3 e 10 dias após lesão.

Valores são expressos como média e desvio padrão; $n = 4$. Crio 3 d: Músculo criolesado e analisado 3 dias após lesão; Crio 10 d: Músculo criolesado e analisado 10 dias após lesão. Dados expressos como porcentagem da área de secção muscular total dos músculos corados com azul de toluidina dos animais FVB e β_2 KO. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. [#] $p \leq 0,05$ vs. FVB do mesmo período; ^b $p \leq 0,05$ vs. Crio 3 d.

FONTE: Silva et al. (2014)

Figura 7D - Porcentagem do número de fibras musculares com núcleo centralizado nos músculos dos animais FVB e β_2 KO analisados em 10 e 21 dias após lesão.

Valores são expressos como média e desvio padrão; $n = 3$.

Crio 10 d: Músculo criolesado e analisado 10 dias após lesão; Crio 21 d: Músculo criolesado e analisado 21 dias após lesão. Dados expressos como porcentagem do número total de fibras musculares de toda a área de secção transversal dos músculos corados com azul de toluidina dos animais FVB e β_2 KO. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos.

FONTE: Silva et al. (2014)

Na análise da AST das fibras musculares do grupo FVB, os músculos dos animais criolesados e analisados após 10 dias apresentaram 70% das fibras com AST menor do que $1200 \mu\text{m}^2$, enquanto apenas 15% das fibras dos animais controle foram menores que $1200 \mu\text{m}^2$ ($p \leq 0,05$; Figura 8). O grupo β_2 KO apresentou resposta semelhante ao grupo FVB, com 75% das fibras musculares dos animais que foram criolesados e analisados após 10 dias menores que $1200 \mu\text{m}^2$, comparadas com 21% das fibras musculares dos animais controle ($p \leq 0,05$; Figura 8). A AST das fibras musculares dos animais FVB e β_2 KO criolesados e analisados após 21 dias não foi diferente da AST das fibras musculares de seus respectivos músculos controle (Figura 8).

Os músculos controle dos animais β_2 KO apresentaram mais fibras musculares com menor AST quando comparados aos músculos controle dos animais FVB, sendo que 59% das fibras musculares dos animais β_2 KO eram menores que $2000 \mu\text{m}^2$ e 54% das fibras musculares dos animais FVB eram menores que $2000 \mu\text{m}^2$ ($p \leq 0,05$; Figura 8). Os músculos dos animais β_2 KO criolesados e analisados em 10 dias após criolesão apresentaram 62% das fibras entre 400 e $1200 \mu\text{m}^2$, enquanto que a porcentagem encontrada nos músculos dos animais FVB foi de 54% ($p \leq 0,05$; Figura 8). Em 21 dias após criolesão não ocorreu diferenças da AST das fibras musculares entre os grupos β_2 KO e FVB (Figura 8).

Figura 8 - Frequência de distribuição da área de secção transversal das fibras musculares dos músculos dos animais FVB e β_2 KO.

AST: Área de secção transversal; C: Músculo controle; Crio 10 d: Músculo criolesado e analisado em 10 dias após lesão; Crio 21 d: Músculo criolesado e analisado em 21 dias após lesão. Frequências de distribuição das áreas de secção transversal (AST) das fibras musculares dos músculos TA. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar diferenças entre os grupos, $n = 3$.
 FONTE: Silva et al. (2014)

5.3 Densidade de tecido conjuntivo

Os músculos dos animais FVB criolesados e analisados após 10 e 21 dias apresentaram aumento de 115% e 100%, respectivamente, da densidade de área de tecido conjuntivo comparados aos seus respectivos controles ($p \leq 0,05$; Figura 9). Os músculos dos animais β_2 KO criolesados e analisados após 10 dias tiveram aumento de 61% na densidade de área de tecido conjuntivo comparados aos seus respectivos controle ($p \leq 0,05$; Figura 9). Em 21 dias após criolesão, os músculos dos animais β_2 KO apresentaram queda na densidade de área de tecido conjuntivo de 30% comparados aos músculos dos animais β_2 KO analisados em 10 dias após lesão ($p \leq 0,05$; Figura 9).

Os músculos controle e criolesados analisados em 10 e 21 dias após lesão do grupo β_2 KO apresentaram aumento de 123%, 67% e 26% na densidade de tecido conjuntivo, respectivamente, quando comparados aos músculos dos animais FVB analisados nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$; Figura 9).

Figura 9 - Imagem representativa da secção transversal dos músculos corados com *picrossirius red* e densidade de área do tecido conjuntivo nos músculos controle e criolesados e analisado após 10 e 21 dias dos animais FVB e β_2 KO.

Coloração com *picrossirius red* realizada nos músculos controle (a e d), 10 dias após criolesão (b e e) e 21 dias após criolesão (c e f) dos animais FVB (a, b e c) e β_2 KO (d, e e f). Barra: 50 μ m.

C: Músculo controle; Crio 10 d: músculo criolesado analisado 10 dias após lesão; Crio 21 d: músculo criolesado analisado 21 dias após lesão. Dados expressos como porcentagem de tecido conjuntivo presente nos músculos corados com *picrossirius red* dos animais FVB e β_2 KO. Valores são expressos como média e desvio padrão; $n = 5$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. * $p \leq 0,05$ vs. respectivo C; # $p \leq 0,05$ vs. grupo FVB; ° $p \leq 0,05$ vs. respectivo Crio 10 d.

5.4 Número e fenótipo dos macrófagos

5.4.1 Incidência de macrófagos positivos para Mac387

No período de 3 e 10 dias após criolesão, o número de macrófagos presentes nos músculos dos animais FVB e β_2 KO aumentou quando comparado aos seus respectivos controles (FVB: 4978% e 3988%, respectivamente; β_2 KO: 10038% e 8572%, respectivamente; $p \leq 0,05$; Figura 10). Adicionalmente, em 3 e 10 dias após criolesão, o número de macrófagos nos músculos dos animais β_2 KO foi 157% e 173% respectivamente maior do que o número de macrófagos observado nos músculos dos animais FVB analisados nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$; Figura 10).

Figura 10 - Incidência de macrófagos por milímetro cúbico (mm^3) nos músculos de camundongos FVB e β_2 KO controles e criolesados e analisado após 3 e 10 dias.

Crio 3 d: músculo criolesado e analisado 3 dias após lesão; Crio 10 d: músculo criolesado e analisado 10 dias após lesão. Dados são expressos como média e desvio padrão; $n = 3$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. * $p \leq 0,05$ vs. C; # $p \leq 0,05$ vs. grupo FVB.

FONTE: Silva et al. (2014)

5.4.2 Genes associados aos macrófagos M1 e M2

A expressão gênica de IL-1 β e arginase-1 não foi alterada em todos os grupos avaliados (Figura 11).

A expressão do RNAm de iNOS não foi alterada nos músculos dos animais FVB avaliados em 1, 3 e 10 dias após criolesão quando comparada à expressão do seu controle (Figura 11). Por outro lado, em 1 dia após a criolesão a expressão do

RNA*m* de iNOS nos músculos dos camundongos β_2 KO aumentou 705% quando comparada à expressão do seu respectivo controle, e 1116% quando comparada à expressão nos músculos dos camundongos FVB avaliados no mesmo período ($p \leq 0,05$; Figura 11). Em contraste, nos períodos de 3 e 10 dias após lesão ocorreu queda na expressão do RNA*m* de iNOS nos músculos dos animais β_2 KO quando comparada à expressão no período de 1 dia após criolesão (89% e 82%, respectivamente; $p \leq 0,05$; Figura 11).

A expressão gênica de Fizz-1 não foi alterada nos músculos dos animais FVB nos diferentes períodos analisados (Figura 11). Entretanto, nos músculos controle dos animais β_2 KO, a expressão gênica de Fizz-1 foi maior quando comparada àquela encontrada nos músculos controle dos animais FVB (1238%, $p \leq 0,05$; Figura 11). Em contraste, expressão gênica de Fizz-1 diminuiu nos músculos lesados e analisados em 1, 3 e 10 dias após criolesão, quando comparada àquela em seu controle (96%, 99% and 92%, respectivamente, $p < 0,05$, Figura 11).

Figura 11 - Expressão gênica de iNOS (A), IL-1 β (B), arginase-1 (C) e fizz-1 (D) analisadas em 1, 3 e 10 dias após criolesão nos músculos dos animais FVB e β_2 KO.

C: Músculo controle; Crio 1 d: músculo criolesado analisado 1 dia após lesão; Crio 3 d: músculo criolesado analisado 3 dias após lesão; Crio 10 d: músculo criolesado analisado 10 dias após lesão. Dados são expressos como média e desvio padrão; $n = 4-5$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. * $p \leq 0,05$ vs. C; [#] $p \leq 0,05$ vs. grupo FVB; ^a $p \leq 0,05$ vs. Crio 1 d.

FONTE: Silva et al. (2014)

5.4.3 População de células positivas para CD11b, CD86 e CD206

A população de células positivas para CD11b aumentou nos músculos em regeneração dos animais FVB e β_2 KO analisados em 3 e 10 dias após lesão quando comparada àquela em seus respectivos músculos controle (FVB: 557% e 286%, respectivamente; $p \leq 0,05$; β_2 KO: 459% e 419%, respectivamente, $p \leq 0,05$; Figura 12), sendo que este aumento foi 46% maior nos músculos dos animais β_2 KO no período de 3 dias após lesão quando comparado aos músculos dos animais FVB analisados no mesmo período ($p \leq 0,05$; Figura 12).

A porcentagem de células positivas para CD86 dentro da população positiva para CD11b nos músculos dos animais FVB e β_2 KO analisados em 3 após lesão não apresentou alterações. Entretanto, em 10 dias após lesão essa porcentagem aumentou quando comparada aos seus respectivos controles (FVB: 66%; β_2 KO: 122%, respectivamente, $p \leq 0,05$; Figura 12) Adicionalmente, a porcentagem de células positivas para CD86 apresentou uma tendência de aumento nos músculos em regeneração dos animais β_2 KO quando comparada à porcentagem encontrada nos músculos dos animais FVB avaliados nos mesmos períodos (Figura 12).

A porcentagem de células positivas para CD206 dentro da população positiva para CD11b nos músculos dos animais FVB e β_2 KO analisados em 3 e 10 dias após lesão diminuiu quando comparada à porcentagem em seus respectivos músculos controle (FVB: 96% e 50%, respectivamente; $p \leq 0,05$; β_2 KO: 94% e 47%, respectivamente, $p \leq 0,05$; Figura 12).

Figura 12 - Porcentagem da população positiva para CD11b e de células positivas para CD86 e CD206 dentro da população positiva para CD11b nos músculos controle e criolesados analisados em 3 e 10 dias após lesão dos animais FVB e β_2 KO.

C: Músculo controle; Crio 3 d: músculo criolesado analisado 3 dias após lesão; Crio 10 d: músculo criolesado analisado 10 dias após lesão. Dados são expressos como média e desvio padrão; $n = 3-5$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. * $p \leq 0,05$ vs. C; # $p \leq 0,05$ vs. grupo FVB.
 FONTE: Silva et al. (2014)

5.5 Ativação de T β R-I e smad2/3

Com relação à imunodeteção de T β R-I fosforilado, os músculos controle de ambos os grupos FVB e β_2 KO não apresentaram imunopositividade para T β R-I (dados não mostrados). A área positiva para T β R-I nos músculos lesados e analisados após 3 dias dos camundongos β_2 KO foi 64% menor que a área positiva nos músculos dos animais FVB analisados no mesmo período ($p \leq 0,05$; Figura 13). Similarmente, não foi possível observar os núcleos positivos para smad2/3 nos músculos controle dos animais FVB e β_2 KO (dados não mostrados). Em 3 dias após lesão, a porcentagem de núcleos positivos para smad2/3 nos músculos dos animais β_2 KO foi 28% menor do que a porcentagem encontrada nos músculos dos animais FVB avaliados no mesmo período ($p \leq 0,05$; Figura 14).

Figura 13 - Imagem representativa da secção transversal dos músculos imunomarcados com T β R-I fosforilado e porcentagem da área positiva para T β R-I fosforilado nos músculos controle e criolesados e analisados após 3 dias dos animais FVB e β_2 KO.

Imunomarcagem para TβR-I fosforilado realizada 3 dias após criolesão. a and d: DAPI (azul:núcleo corado) músculo dos camundongos FVB e β₂KO, respectivamente; b e e: imunomarcagem para TβR-I fosforilado (vermelho; TGF-β RI) nos animais FVB e β₂KO, respectivamente; c e f: co-marcação para TGF-β RI e DAPI músculo dos camundongos FVB e β₂KO, respectivamente. Cabeças de seta indicam núcleo marcado com dapi (a, d), TβR-I ativado/fosforilado (b,e) ou a co-marcação de dapi com TβR-I ativado/fosforilado (c, f). Barra: 50 μm.

C: Músculo controle; Crio 3 d: músculo criolesado e analisado 3 dias após lesão. Dados são expressos como média e desvio padrão; *n* = 3. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. [#]*p* ≤ 0,05 vs. grupo FVB.

FONTE: Silva et al. (2014)

Figura 14 - Imagem representativa da secção transversal dos músculos imunomarcados com smad2/3 e incidência de núcleos positivos para smad2/3 por milímetro quadrado (mm²) nos músculos controle e criolesados e analisados após 3 dias dos animais FVB e β₂KO.

Imunomarcção para smad2/3 realizada 3 dias após criolesão. a and d: DAPI (azul:núcleo corado) músculo dos camundongos FVB e β_2 KO, respectivamente; b e e: imunomarcção para smad2/3 (vermelho; smad2/3) nos animais FVB e β_2 KO, respectivamente; c e f: co-marcação para smad2/3 e DAPI músculo dos camundongos FVB e β_2 KO, respectivamente. Cabeças de seta indicam núcleo marcado com dapi (a, d), smad2/3 (b,e) ou a co-marcação de dapi com smad2/3 (c, f). Barra: 50 μ m. C: Músculo controle; Crio 3 d: músculo criolesado analisado 3 dias após lesão. Dados são expressos como média e desvio padrão; $n = 3$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. [#] $p \leq 0,05$ vs. FVB. FONTE: Silva et al. (2014)

5.6 Expressão de smad4 e akirina1

Em 3 dias após criolesão, a expressão de smad4 diminuiu nos músculos lesados dos animais FVB e β_2 KO comparada à expressão em seus respectivos músculos controle (25% e 41%, respectivamente; $p \leq 0,05$; Figura 15). De forma similar, em 10 dias após criolesão, a expressão de smad4 diminuiu nos músculos lesados dos animais FVB e β_2 KO comparada à expressão em seus respectivos músculos controle (29% and 25%, respectivamente; $p \leq 0,05$; Figura 15). Além disso, a expressão de smad4 nos músculos controle dos animais β_2 KO diminuiu quando comparada àquela observada nos músculos controle dos animais FVB (24%; $p \leq 0,05$; Figura 15).

A expressão de akirina1 não foi detectada nos músculos controle dos animais FVB e β_2 KO (Figura 15), porém foi altamente expressa em 10 dias após criolesão nos músculos dos animais FVB e β_2 KO quando comparada à expressão em seus respectivos músculos controle (1931% e 2387%, respectivamente; $p \leq 0,05$; Figura 15). Adicionalmente, a expressão de akirina1 nos músculos dos animais β_2 KO analisados 10 dias após criolesão foi maior comparada à sua expressão nos músculos lesados dos animais FVB analisados no mesmo período (95%; $p \leq 0,05$; Figura 15).

Figura 15 - Expressão de smad4 e akirina1 e suas respectivas densitometrias nos músculos dos animais FVB e β_2 KO.

Western blots representativo do músculo controle e criolesado analisado em 3 e 10 dias após lesão. Blots contendo 50 μ g de proteína por poço. Membranas incubadas com anticorpo específico para as proteínas smad4 e akirina1 (gel de SDS-PAGE 7% e 12%, respectivamente) e subsequentemente incubadas com GAPDH, utilizado como normalizador. Blots com 50 μ g de proteína por poço. Dados são expressos como média e desvio padrão da unidade arbitrária, $n = 3$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. * $p \leq 0,05$ vs. C; # $p \leq 0,05$ vs. FVB.

FONTE: Silva et al. (2014)

5.7 Níveis de AMPc

Não foi possível observar diferenças nos níveis de AMPc entre os músculos controle dos animais FVB e β_2 KO (Figura 16). Como esperado, após 10 dias, a criolesão induziu aumento de 228% nos níveis de AMPc nos músculos dos animais FVB ($p \leq 0,05$; Figura 16). O aumento nos níveis de AMPc nos músculos dos animais β_2 KO analisados no mesmo período após criolesão foi atenuado comparado aos níveis do seu controle (125%, $p \leq 0,05$; Figura 16).

Figura 16 - Níveis de AMPc nos músculos dos camundongos FVB e β_2 KO.

C: Músculos controle; Crio 10 d: músculos criolesados e analisados após 10 dias. Dados são expressos como média e desvio padrão; $n = 7$. ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas. * $p \leq 0,05$ vs. controle; # $p \leq 0,05$ vs. FVB.

FONTE: Silva et al. (2014)

5.8 Forças tetânica máxima, específica e resistência à fadiga

O papel do adrenoceptor β_2 na recuperação funcional dos músculos após criolesão foi avaliado por meio da análise da força tetânica máxima, da força específica e da resistência à fadiga em 10 dias após lesão.

Na medida da contração tetânica pré-fadiga, a força absoluta e a específica diminuíram 34% e 43%, respectivamente, nos músculos criolesados dos animais FVB quando comparada às contrações de seus músculos controle ($p \leq 0,05$, Figura 17). Da mesma forma, a força absoluta e a específica diminuíram 43% e 27%, respectivamente, nos músculos lesados dos animais β_2 KO, quando comparadas àquelas dos músculos controle ($p \leq 0,05$, Figura 17). Os músculos controle dos animais β_2 KO apresentaram 17% de redução na força absoluta e 29% de redução

na força específica, quando comparados aos músculos controle dos animais FVB ($p \leq 0,05$, Fig. 17). Similarmente, os músculos lesados dos animais β_2 KO apresentaram redução de 17% na força absoluta e 17% na força específica, quando comparados aos músculos lesados dos animais FVB ($p \leq 0,05$, Figura 17).

Com relação às medidas de força tetânica absoluta e específica pós-fadiga, foi observada uma redução em ambas nos músculos lesados dos animais FVB e β_2 KO quando comparadas às forças de seus respectivos músculos controle (FVB: 42% e 40%, respectivamente; β_2 KO: 43% e 24%, respectivamente; $p \leq 0,05$, Figura 17). Da mesma forma que na medida da contração tetânica pré-fadiga, os músculos controle e lesados dos animais β_2 KO apresentaram menor força absoluta e específica, quando comparados aos músculos dos animais FVB (músculos controle: 24% e 34% de redução, respectivamente; músculos criolesados: 26% e 16% de redução, respectivamente; $p \leq 0,05$, Figura 17).

A força absoluta e a específica analisadas pós-fadiga diminuíram quando comparadas às forças pré-fadiga, em ambos os animais FVB e β_2 KO (músculos controle dos animais FVB: 11% e 9% de redução, respectivamente; músculos criolesados dos animais FVB: 10% e 13% de redução, respectivamente; músculos controle dos animais β_2 KO: 20% e 16% de redução, respectivamente; músculos criolesados dos animais β_2 KO: 19% e 13% de redução, respectivamente; $p \leq 0,05$, Figura 17).

A força muscular foi medida em quatro diferentes tempos durante o protocolo de fadiga (1ª, 4ª, 7ª e 10ª contração). Nos músculos controle dos animais FVB e β_2 KO houve significativa perda de força muscular iniciando na 4ª contração do protocolo de fadiga (12% e 11% de redução comparada à 1ª contração, respectivamente), sendo que tal diferença persistiu até a 10ª contração ($p \leq 0,05$, Figura 17). Igualmente, a força muscular na 1ª contração foi menor nos músculos criolesados comparada à força nos músculos controle de ambos os animais FVB e β_2 KO (39% e 45%, respectivamente; $p \leq 0,05$, Figura 17). Nos músculos criolesados dos animais FVB e β_2 KO, a força muscular foi menor na 4ª, 7ª e 10ª contração, em comparação com a 1ª contração (FVB: 13%, 18% e 77%, respectivamente; β_2 KO: 11%, 19% e 25% respectivamente; $p \leq 0,05$, Figura 17). Adicionalmente, a força nos músculos controle e criolesados dos animais β_2 KO diminuiu quando comparada à força de seus respectivos músculos controle e lesados dos animais FVB em todas as

contrações (1ª, 4ª, 7ª e 10ª contração) analisadas (C: 17%, 16%, 15% e 38%, respectivamente; Crio: 25%, 24%, 27% e 27%, respectivamente; $p \leq 0,05$, Figura 17).

Figura 17 - Comparação da força tetânica máxima (A, mN), da força específica (B) e da produção de força durante o protocolo de 10 contrações musculares (C, resistência à fadiga) analisadas nos músculos controle e criolesados dos animais FVB e β_2 KO.

C: Músculo controle; Crio: músculo criolesado analisado 10 dias após lesão. Pré-fadiga: contração tetânica máxima realizada após do protocolo de fadiga. Valores são expressos como média e desvio padrão; $n = 8-10$. Teste de modelos mistos para medidas repetidas foi aplicado para testar as diferenças entre os grupos. * $p \leq 0,05$ vs. C; ^a $p \leq 0,05$ vs. Pré-fadiga; [#] $p \leq 0,05$ vs. grupo FVB no gráfico de força tetânica máxima e força específica. * $p \leq 0,05$ vs. C; ^a $p \leq 0,05$ vs. 1ª contração; [#] $p \leq 0,05$ vs. grupo FVB no gráfico de fadiga.

FONTE: Silva et al. (2014)

6 DISCUSSÃO

A regeneração muscular esquelética é um processo crucial e contribui para a recuperação e manutenção da massa e função muscular ao longo da vida. O presente estudo indicou que o adrenoceptor β_2 tem um papel importante na regeneração muscular, uma vez que a deleção desse receptor acarretou em prejuízo estrutural e funcional do processo regenerativo do músculo esquelético. Os períodos de 1, 3, 10 e 21 dias após lesão foram avaliados, pois representam importantes fases do processo regenerativo do músculo, incluindo intensa necrose e edema, inflamação e proliferação de células satélites, franca regeneração com reestabelecimento das proteínas miofibrilares, e restauração das propriedades estruturais e contráteis do músculo esquelético, respectivamente (Hawke, Garry, 2001; Miyabara et al., 2006).

O aumento no ganho de peso corporal dos animais β_2 KO quando comparado ao ganho de peso dos animais FVB, sugere que o adrenoceptor β_2 contribui para a regulação do peso corporal. Tal achado está em conformidade com estudos que mostram que a estimulação β_2 -adrenérgica promove lipólise (Hinkle et al., 2002; Kim, Kong, 2010; Kim et al., 2010; Louis et al., 2000; Lynch, Ryall, 2008; Zhang et al., 2007) e contribui para o mecanismo de captação de glicose nos adipócitos marrons de camundongos e ratos (Chernogubova et al., 2004; Marette, Bukowiecki, 1990; Shimizu et al., 1996). Agonistas β_2 -adrenérgicos são conhecidos por induzir lipólise por meio da ativação de G α -AC-AMPC seguida da estimulação de PKA; a PKA promove a fosforilação da *adipose triglyceride lipase*, da lipase hormônio-sensível (LHS) e da proteína perilipina A (*lipid-bound protein perilipin A*). Tal fosforilação resulta em aumento da hidrólise de triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis, e na liberação de ácidos graxos dos adipócitos (Holm, 2003; Pagnon et al., 2012). Sendo assim, sugere-se que a ausência do adrenoceptor β_2 poderia contribuir para o acúmulo de massa gorda.

O peso muscular em 1 dia após criolesão em animais FVB aumentou, o que está relacionado à inflamação e edema característico deste período (Miyabara et al., 2006, 2010). Sabe-se que após lesão muscular ocorre ruptura do sarcolema resultando em aumento da permeabilidade muscular (Charge, Rudnicki, 2004). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a invadir o músculo lesado (Orimo

et al., 1991) e estudos mostram que estas células liberam radicais livres e proteases (Pizza et al., 2002; Tidball, 1995). Além disso, os neutrófilos secretam citocinas que ativam as células satélites, contribuindo assim para a regeneração muscular (Rosen et al., 1992; Seale, Rudnicki, 2000). Em seguida, os macrófagos se tornam as células inflamatórias predominantes no sítio da lesão aumentando sua concentração em 1 a 3 dias após a lesão (Orimo et al., 1991) sendo responsáveis pela fagocitose e digestão das fibras musculares necrosadas e pela secreção de citocinas que são capazes de ativar as células satélites (Cantini et al., 1995; Chen et al., 2005; Li, 2003; Serrano et al., 2008; Szalay et al., 1997; Wang et al., 2008; Warren et al., 2002). Interessantemente, os camundongos do grupo β_2 KO tiveram ganho de peso muscular menor em 1 dia após lesão comparado aos camundongos FVB, o que pode estar relacionado a um atraso na instalação do edema e da inflamação.

O peso muscular dos animais FVB em 3 dias após a criolesão foi semelhante ao peso do músculo controle FVB, sugerindo que houve redução do processo inflamatório. Em 10 dias após a criolesão, o peso muscular do grupo FVB foi menor quando comparado ao seu controle, o que está relacionado com a presença de mínimo infiltrado inflamatório e fibras musculares em regeneração com tamanho reduzido (Conte et al., 2012; Miyabara et al., 2006, 2010); o que também foi verificado em nosso estudo. Como esperado, a estrutura muscular dos animais FVB foi reestabelecida em 21 dias após lesão (Conte et al., 2012; Miyabara et al., 2006, 2010). Entretanto, nos animais β_2 KO, o peso muscular nos períodos de 3, 10 e 21 dias após lesão não foi diferente do peso do músculo controle β_2 KO, sugerindo uma possível persistência do processo inflamatório em períodos mais crônicos após a lesão. Esta hipótese foi confirmada pela análise histológica, que mostrou a intensa presença de células inflamatórias nos músculos dos animais β_2 KO analisados em 10 dias após lesão quando comparados aos músculos dos animais FVB lesados e analisados no mesmo período.

A maior área de inflamação e o maior número de macrófagos observados nos músculos em regeneração dos animais β_2 KO analisados em 10 dias após lesão, provavelmente acarretou em déficit na regeneração muscular. Estudos mostram que os macrófagos favorecem a regeneração muscular, devido ao seu papel na remoção de debris celulares e por contribuir para a indução do aumento na taxa de proliferação de mioblastos (Arnold et al., 2007; Cantini et al., 2002; Honda et al.,

1990; Merly et al., 1999; Teixeira et al., 2003; Tidball, Wehling-Henricks, 2007). Por outro lado, a infiltração de células inflamatórias em excesso no músculo esquelético pode intensificar os mecanismos envolvidos na lesão muscular (Nguyen et al., 2005; Villalta et al., 2009) e prejudicar o processo regenerativo (Acharyya et al., 2007). Portanto, é provável que a persistência da inflamação após lesão nos músculos dos animais β_2 KO atrasou o processo regenerativo destes, o que sugere que o adrenoceptor β_2 esteja envolvido com a modulação do processo inflamatório durante a regeneração muscular. Alguns estudos contribuem para esta hipótese, pois relatam que a estimulação do adrenoceptor β_2 por meio de agonistas reduz a inflamação muscular (Conte et al., 2012; Roberts, McGeachie, 1992; Pullar et al., 2008; Zhang et al., 2010). Desta forma, é provável que o adrenoceptor β_2 desempenhe um papel na regulação do processo inflamatório. Sendo assim, a investigação de possíveis mecanismos envolvidos no recrutamento de células inflamatórias durante a regeneração muscular foi realizada. Nesse sentido, os resultados encontrados sugerem que na ausência do adrenoceptor β_2 , pode ocorrer aumento na frequência de macrófagos M1 no músculo em regeneração, indicado pelo intenso aumento na expressão gênica de iNOS em 1 dia após lesão e pela tendência de aumento no número de células positivas para CD86 em 3 e 10 dias após lesão, o que poderia resultar em atraso na conversão do fenótipo do macrófago M1 para M2, e consequentemente, atraso no processo de regeneração muscular. De fato, a mudança do fenótipo de macrófagos M1 para M2 é essencial para a progressão da diferenciação miogênica e regeneração muscular (Szalay et al., 1997; Tsujinaka et al., 1996; Wang et al., 2014).

Um possível mecanismo envolvido na mudança do fenótipo de macrófagos M1 para M2 envolvendo o adrenoceptor β_2 é a produção de AMPc (Guereschi et al., 2013; Panina-Bordignon et al., 1997). Os resultados deste estudo indicam que o aumento nos níveis de AMPc foi atenuado no músculo em regeneração dos animais β_2 KO. Entretanto, os mecanismos de sinalização *downstream* ainda não são bem compreendidos. Outra possibilidade poderia envolver a transativação do receptor T β R-I através do adrenoceptor β_2 (Figura 18). Mais especificamente, sabe-se que GPCRs, são capazes de transativar receptores do tipo serina treonina kinase (S/TK), levando à ativação e fosforilação da superfície celular do receptor S/TK e início de sua sinalização (Burch et al., 2012) (Figura 18).

Figura 18 - Representação da via de sinalização β_2 -adrenérgica e da transativação do receptor T β R-I.

O esquema resume os mecanismos e as possíveis vias envolvidas nos resultados encontrados. Quando um agonista se liga ao adrenoceptor β_2 ocorre aumento do conteúdo de AMPc e da fosforilação de AKT, aumentando sua expressão e levando ao aumento de síntese proteica e da AST, tanto por mecanismos envolvendo a via clássica quanto a via não-clássica. Além disso, AKT fosforilado poderia inibir a ativação de FOXO, inibindo a ativação de genes envolvidos na degradação proteica como muRF1 e atrogina-1. A ativação do adrenoceptor β_2 também acarretaria na transativação do receptor T β R-I que por sua então fosforila as proteínas smad2 e smad3, que se unem à smad4. Esse conjunto de smads transloca-se para o núcleo e interage com fatores que regulam a transcrição de genes alvo que poderiam causar: inibição da transcrição de akirina1 o que poderia acarretar em diminuição no número de macrófagos; inibição da transcrição de fatores regulatórios miogênicos, diminuindo a ativação e a proliferação; e também a ativação da transcrição de colágeno e fibronectina o que poderia aumentar a fibrose. Finalmente a administração de agonista acarreta em aumento da força muscular e consequentemente melhora da função contrátil.

Pearen et al. (2009), mostrou que a administração aguda (1-8 h) do agonista β_2 -adrenérgico formoterol em camundongos aumenta a expressão gênica de smad3 no tecido muscular. Portanto, é possível que a ausência do adrenoceptor β_2 poderia inibir a transativação de T β R-I, e subsequentemente inibir seus alvos *downstream*, as proteínas smad, o que poderia levar ao aumento da expressão de akirina1. De fato, foi observada redução na ativação de T β R-I e smad2/3 e diminuição na expressão de smad4 nos músculos em regeneração dos animais β_2 KO em 3 dias após lesão. Como consequência, ocorreu aumento na expressão de akirina1 nos músculos em regeneração dos animais β_2 KO em 10 dias após lesão.

A expressão de akirina1 nos macrófagos, assim como, suas propriedades quimioatraente (Salerno et al., 2009), poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento na densidade de macrófagos e sua persistência nos músculos em regeneração dos animais β_2 KO em 10 dias após lesão. Estudos mostraram que akirina1 é expressa em mioblastos em proliferação (Langley et al., 2002; Marshall et al., 2008; Salerno et al., 2009) e sua expressão é aumentada durante a diferenciação destes no músculo em regeneração de camundongos *knockout* para miostatina (Salerno et al., 2009). Além disso, o silenciamento de akirina1 em células musculares C2C12 reduz a expressão das proteínas MyoD e miogenina, sugerindo que akirina1 é uma importante reguladora da expressão desses fatores (Marshall et al., 2008).

Com base no exposto, acredita-se que a diminuição da ativação de T β R-I e smad2/3 e da expressão de smad4 no período de 3 dias após lesão, associados ao aumento da expressão proteica de akirina1 em 10 dias após lesão observados no grupo β_2 KO, seja um mecanismo compensatório no intuito de amenizar as consequências do processo inflamatório exacerbado e favorecer a regeneração muscular. Tal hipótese pode ser corroborada pelo fato de que os músculos dos animais β_2 KO em 21 dias após lesão recuperam sua estrutura de forma similar à dos músculos do grupo FVB, apresentando fibras musculares com núcleo centralizado de tamanho semelhante àsquelas dos animais FVB, aparente redução do processo inflamatório e densidade do tecido conjuntivo próxima à do grupo FVB, porém com suposta presença de adipócitos, o que precisa ser confirmada em experimentos futuros.

O aumento no tamanho da fibra muscular durante a regeneração parece ser parcialmente regulado pelo adrenoceptor β_2 , como demonstrado pela moderada redução no calibre das fibras musculares em regeneração dos animais β_2 KO em 10 dias após criolesão, quando comparado ao calibre das fibras musculares em regeneração dos animais FVB. Tal resultado pode ser explicado, de certa forma, pelo atenuado aumento nos níveis de AMPc nos músculos em regeneração dos animais β_2 KO. Notavelmente, este achado está de acordo com estudos prévios que indicam que a estimulação β_2 -adrenérgica com agonistas após lesão muscular acarreta em aumento dos níveis de AMPc e do calibre da fibra muscular em regeneração (Beitzel et al., 2004; Bricout et al., 2004; Beitzel et al., 2007; Conte et

al., 2012; Roberts, McGeachie, 1992), além disso, tais efeitos podem ser revertidos com o uso do antagonista β_2 -adrenérgico ICI-118551 (McCormick et al., 2010; Zhong et al., 1996).

A densidade da área de tecido conjuntivo muscular se mostrou maior tanto no músculo controle quanto nos músculos criolesados do grupo β_2 KO analisados após 10 e 21 dias quando comparada à dos respectivos músculos do grupo FVB, efeito este que pode ser corroborado com estudos que mostram que a estimulação dos adrenoreceptores β_2 através do tratamento com agonistas seletivos a este receptor, reduz o conteúdo de tecido conjuntivo em músculos em regeneração, melhora a reparação vascular (Roberts, McGeachie, 1992) e o remodelamento de componentes da matriz extracelular (Conte et al., 2012; Pullar et al., 2008; Zhang et al., 2010). Sendo assim, sugere-se que o adrenoreceptor β_2 poderia participar do processo de remodelamento e reparo da matriz extracelular muscular.

Diversos estudos relatam que a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos favorece o ganho de massa muscular (Agrawal et al., 2003; Conte et al., 2012; Harcourt et al., 2007; Lynch, Ryall, 2008; Ryall et al., 2006). Trabalhos demonstram que a massa muscular pode ser regulada por elementos da via clássica $G\alpha_s$ /AC/AMPC e por elementos da via não-clássica PI3K/AKT/mTOR (Hinkle et al., 2002; Navegantes et al., 2002). A via clássica $G\alpha_s$ /AC/AMPC participa da ativação de vias indutoras de síntese proteica (Hinkle et al., 2002; Navegantes et al., 2002) e também da inibição da ação proteolítica das enzimas calpaínas (Hawkins et al., 1995; Navegantes et al., 2001; Reiken et al., 2003; Koopman et al., 2010). Como previamente descrito, a via não-clássica é mediada pelas subunidades β e γ da proteína G, que acarretam na ativação da via PI3K/AKT/mTOR (Hinkle et al., 2002), a qual estimula o aumento da síntese proteica e consequentemente, o ganho de massa muscular. Nosso grupo demonstrou recentemente que a estimulação β_2 -adrenérgica, por meio do agonista formoterol, acarreta em aumento de síntese proteica através da ativação de mTOR, tanto em músculos não lesados como em músculos em regeneração (Conte et al., 2012). Entretanto, os dados analisados no presente estudo não mostraram quaisquer alterações da expressão dos elementos da via não clássica PI3K/AKT/mTOR nos grupos avaliados (dados não mostrados). Uma menor AST das fibras musculares de animais β_2 KO também foi observada no estudo de Voltarelli et al. (2012), o qual também não verificou alteração da via

PI3K/AKT/mTOR, sugerindo que outros mecanismos devem participar da modesta regulação da massa muscular envolvendo o adrenoceptor β_2 .

Com relação aos resultados de contração muscular, a diminuição da função contrátil nos músculos dos animais β_2 KO pode ser devido à um prejuízo nos mecanismos contráteis causados pela ausência do adrenoceptor β_2 , ao invés de uma maior susceptibilidade à lesão, visto que os músculos dos animais β_2 KO tiveram o número de fibras musculares necrosadas similar ao observado nos músculos dos animais FVB. Em conformidade com os achados do presente estudo, outro estudo mostrou que a estimulação da bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ com o agonista β_2 -adrenérgico, salbutamol, epinefrina e *rat calcitonin gene-related peptide* (rCGRP), ou o *dibutyryl cAMP*, melhorou a recuperação da força muscular em torno de 40% a 90% (Mikkelsen et al., 2006). Adicionalmente, o agonista β_2 -adrenérgico terbutalina potencializa o pico de contração isolada e a força tetânica no músculo sóleo de rato, os quais estão associados com o aumento de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Ha et al., 1999). Considerando que este efeito é consistente com o mecanismo pelo qual a terbutalina ativa o adrenoceptor β_2 , levando, de maneira dependente de PKA, à fosforilação do receptor de rianodina (Ha et al., 1999) com consequente aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Cairns et al., 1993) e que este efeito da terbutalina é bloqueado após administração do antagonista β_2 -adrenérgico ICI-118551; acredita-se que a diminuição na força tetânica absoluta e específica encontrada nos músculos dos camundongos β_2 KO pode ter ocorrido devido à uma atenuação na fosforilação do receptor de rianodina por meio da PKA.

A ausência do adrenoceptor β_2 , combinada à criolesão, acarretou em menor produção de força muscular, o que pode ser consequência de uma atenuação no aumento de cálcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ associado à pior recuperação da massa muscular nas fibras musculares em regeneração. Os músculos dos animais β_2 KO analisados em 10 dias após criolesão, exibiram maior área de infiltrado inflamatório e fibras musculares em regeneração de menor tamanho comparado aos músculos dos animais FVB. Portanto, sugere-se que estes músculos contêm menos componentes miofibrilares, o que pode ter contribuído para a redução na produção de força. Em conformidade com os efeitos causados pela ausência do adrenoceptor β_2 no músculo em regeneração, foi demonstrado que a administração do agonista β_2 -adrenérgico formoterol foi capaz de diminuir o número de células inflamatórias

presentes no músculo em regeneração, aumentar o tamanho da fibra muscular e, conseqüentemente, aumentar a força muscular (Conte et al., 2012). De fato, estudos relatam que a estimulação β_2 -adrenérgica melhora a geração de força de músculos em regeneração (Beitzel et al., 2004; Ryall et al., 2008b), o que corrobora a hipótese de que o adrenoceptor- β_2 é relevante para a recuperação funcional durante o processo de regeneração muscular.

Visto que não houve diferença na AST da fibra muscular entre o camundongo β_2 KO e o FVB em 21 dias após criolesão, a função muscular não foi avaliada nesse período. Considerando que a estrutura e a função dos músculos em regeneração dos animais β_2 KO analisados 21 dias após criolesão sejam provavelmente similares aos músculos controle, acredita-se que o adrenoceptor β_2 possa estar envolvido na regulação das fases iniciais da regeneração muscular, como inflamação e recuperação do tamanho da fibra muscular, e que por meio de mecanismos compensatórios ainda desconhecidos, o atraso desta fase inicial acaba sendo revertido no decorrer do processo regenerativo muscular.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que o adrenoceptor β_2 contribui, principalmente, para os estágios iniciais da regeneração muscular, sendo particularmente envolvido na regulação do recrutamento de macrófagos para o tecido muscular em regeneração, possivelmente por meio da ativação de T β R-I e smad2/3, assim como da redução da expressão de akirina1 (Figura 19). Desta forma, futuros estudos deveriam investigar o papel do adrenoceptor β_2 como um possível alvo para intervenções terapêuticas por meio de agentes farmacológicos ou terapia gênica, no intuito de acelerar as fases iniciais da regeneração muscular e consequentemente diminuir o período de reabilitação em diversas condições, como em lesões do esporte e aquelas causadas por procedimentos cirúrgicos, acidentes e congelamento.

Figura 19 - Representação hipotética da via de sinalização β_2 -adrenérgica e da transativação do receptor T β R-I em caso de lesão e deleção do adrenoceptor β_2

A criolesão acarretaria em aumento do conteúdo de AMPc e fosforilação de AKT aumentando a síntese proteica e a AST, além da inibição de FOXO diminuindo a degradação proteica. No caso da criolesão associada à ausência do adrenoceptor β_2 ocorre diminuição do conteúdo de AMPc e da fosforilação de AKT, levando à diminuição de síntese proteica e da AST. Além disso, ainda não se conhece o papel de FOXO e, portanto a expressão de genes envolvidos na degradação proteica. O mecanismo de transativação não ocorreria, o que diminuiria a fosforilação de smads e sua translocação para o núcleo, a expressão de akirina1 aumentaria o que acarretaria em aumento no número de macrófagos. Possivelmente a expressão de fatores regulatórios miogênicos estaria aumentada, aumentando a ativação e proliferação de células satélites. E a expressão de colágeno e fibronectina poderia estar diminuída, diminuindo a fibrose. Finalmente a força muscular diminuiria.

REFERÊNCIAS*

Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PM, Carathers M, et al. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2007;117:889-901.

Agrawal S, Thakur P, Katoch SS. Beta adrenoceptor agonists, clenbuterol, and isoproterenol retard denervation atrophy in rat gastrocnemius muscle: use of 3-methylhistidine as a marker of myofibrillar degeneration. *Jpn J Physiol*. 2003;53(3):229-37.

Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*. 1948;153(3):586-600.

Aoki MS, Soares AG, Miyabara EH, Baptista IL, Moriscot AS. Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. *Muscle Nerve*. 2009;40:992-9.

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007;204:1057-69.

Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LC, Kettelhut IC. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;315(1-2):104-12.

Beitzel F, Gregorevic P, Ryall JG, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. *J Appl Physiol*. 2004;96 (4):1385-92.

Beitzel F, Sillence MN, Lynch GS. Beta-Adrenoceptor signaling in regenerating skeletal muscle after beta-agonist administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293 (4):E932-40.

Belcastro AN, Shewchuk LD, Raj DA. Exercise-induced muscle injury: a calpain hypothesis. *Mol Cell Biochem*. 1998;179(1-2):135-45.

Bancroft JD. *Enzyme histochemistry*. New York: Churchill Living-stone. 1996;391-410.

Best TM, Shehadeh SE, Levenson G, Michela JT, Corr DT, Aeschlimann D. Analysis of changes in mRNA levels of myoblast- and fibroblast- derived gene products in healing skeletal muscle using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Orthop Res*. 2001;19:565-72.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bhattacharjee A, Shukla M, Yakubenko VP, Mulya A, Kundu S, Cathcart MK. IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2013;54:1-16.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*. 2001;3(11):1014-9.

Bolster DR, Jefferson LS, Kimball SR. Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid- and exercise-induced signalling. *Proceed Nut Soc*. 2004;63(2):351-6.

Brack AS, Rando TA. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):504-14.

Bricout VA, Serrurier BD, Bigard AX. Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. *Acta Physiol Scand*. 2004;180(3):271-80.

Burch ML, Osman N, Getachew R, Al-Aryahi S, Poronnik P, Zheng W, Hill MA, Little PJ. G protein coupled receptor transactivation: extending the paradigm to include serine/threonine kinase receptors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(5):722-7.

Cairns SP, Westerblad H, Allen DG. Changes of tension and $[Ca^{2+}]_i$ during beta-adrenoceptor activation of single, intact fibres from mouse skeletal muscle. *Pflugers Arch*. 1993;425:150-155.

Cantini M, Massimino ML, Rapizzi E, Rossini K, Catani C, Dalla Libera L, et al. Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;216:49-53.

Cantini M, Giurisato E, Radu C, Tiozzo S, Pampinella F, Senigaglia D, et al. Macrophage-secreted myogenic factors: a promising tool for greatly enhancing the proliferative capacity of myoblasts in vitro and in vivo. *Neurol Sci*. 2002;23:189-94.

Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev*. 2011;10:35-42.

Cassano M, Quattrocchi M, Crippa S, Perini I, Ronzoni F, Sampaolesi M. Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass. *J Muscle Res Cell Motil*. 2009;30(7-8):243-53.

Chan S, Head SI. Age- and gender-related changes in contractile properties of non-atrophied EDL muscle. *PLoS One*. 2010;5(8):e12345.

Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*. 2004;84:209-38.

Chazaud B, Sonnet C, Lafuste P, Bassez G, Rimaniol AC, Poron F, et al. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J Cell Biol.* 2003;163:1133-43.

Chen W, Fu X, Sheng Z. Review of current progress in the structure and function of Smad proteins. *Chin Med J (Engl)*, 2002;115(3):446-50.

Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, et al. Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289:C1179-87.

Chernogubova E, Cannon B, Bengtsson T. Norepinephrine increases glucose transport in brown adipocytes via β 3-adrenoceptors through a cAMP, PKA, and PI3-kinase-dependent pathway stimulating conventional and novel PKCs. *Endocrinology.* 2004;145:269-80.

Cheung TH, Quach NL, Charville GW, Liu L, Park L, Edalati A, et al. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature.* 2012;482:524-8.

Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des.* 2010;16(8):906-14.

Conte TC, Silva LH, Silva MT, Hirabara SM, Oliveira AC, Curi R, et al. The beta2-adrenoceptor agonist formoterol improves structural and functional regenerative capacity of skeletal muscles from aged rat at the early stages of postinjury. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012;67(5):443-55.

Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino F. Ca^{2+} -dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:2134-46.

Chruscinski AJ, Rohrer DK, Schauble E, Desai KH, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the beta2 adrenergic receptor gene. *J Biol Chem.* 1999;274:16694-700.

Doumit ME, Cook DR, Merkel RA. Fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin-like growth factors, and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells. *J Cell Physiol.* 1993;157:326-32.

Dunser MW, Hasibeder WR. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. *J Intensive Care Med.* 2009;24(5):293-316.

Elfellah MS, Dalling R, Kantola IM, Reid JL. Beta-adrenoceptors and human skeletal muscle characterisation of receptor subtype and effect of age. *Br J Clin Pharmacol.* 1989;27:31-8.

Ferrante MI, Kiff RM, Goulding DA, Stemple DL. Troponin T is essential for sarcomere assembly in zebrafish skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 4):565-77.

Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1993;265:R166-72.

Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med.* 2001;29:394-402.

Furuyama T, Yamashita H, Kitayama K, Higami Y, Shimokawa I, Mori N. Effects of aging and caloric restriction on the gene expression of Foxo1, 3, and 4 (FKHR, FKHL1, and AFX) in the rat skeletal muscles. *Microsc Res Tech.* 2002;59(4):331-4.

Fuster G, Busquets S, Ametller E, Olivan M, Almendro V, de Oliveira CC, et al. Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists. *Cancer Res.* 2007;67(13):6512-9.

Gehrig SM, Koopman R, Naim T, Tjoakarfa C, Lynch GS. Making fast-twitch dystrophic muscles bigger protects them from contraction injury and attenuates the dystrophic pathology. *Am J Pathol.* 2010;176:29-33.

Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285(5430):1028-32.

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(25):14440-5.

Greene EA, Allen RE. Growth factor regulation of bovine satellite cell growth in vitro. *J Anim Sci.* 1991;69:146-52.

Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW. Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev.* 2007;16(5):857-68.

Grounds MD, Yablonka-Reuveni D. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser.* 1993;3:210-56.

Guereschi MG, Araujo LP, Maricato JT, Takenaka MC, Nascimento VM, Vivanco BC, et al. Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. *Eur J Immunol.* 2013;43:1001-12.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 2010. 12 ed. pp. 1120.

Ha TNV, Posterino GS, Fryer MW. Effects of terbutaline on force and intracellular calcium in slow-twitch skeletal muscle fibres of the rat. *Br J Pharmacol.* 1999;126:1717-24.

Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, Kasuga M, Nishimoto I, Avruch J. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26457-63.

Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *Biol Chem*. 1998;273(23):14484-94.

Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS. Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue. *Neuromuscul Disord*. 2007;17:47-55.

Harridge SD. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp Physiol*. 2007;92(5):783-97.

Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;91(2):534-51.

Hawkins C, Xu A, Narayanan N. Comparison of the effects of the membrane-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase on Ca(2+)-ATPase function in cardiac and slow-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem*. 1995;142(2):131-8.

Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK, Isfort RJ. Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve*. 2002;25(5):729-34.

Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1120-4.

Honda H, Kimura H, Rostami A. Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle. *Immunology*. 1990;70:272-7.

Huxley AF. Cross-bridge action: present views, prospects, and unknowns. *J Biomech*. 2000;33(10):1189-95.

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2004;287(4):C834-43.

Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745-64.

Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Aärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, et al. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007;21(2):317-31.

Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, et al. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol*. 2010;12:153-63.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*. Brasil: Guanabara Koogan: 12ed. p.538 2013.

Kääriäinen M, Kääriäinen J, Järvinen TL, Nissinen L, Heino J, Järvinen M, et al. Integrin and dystrophin associated adhesion protein complexes during regeneration of shearing-type muscle injury. *Neuromuscul Disord*. 2000;10(2):121-32.

Karagounis LG, Hawley JA. Skeletal muscle: increasing the size of the locomotor cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(9):1376-9.

Kenley RA, Denissenko MF, Mullin RJ, Story J, Ekblom J. Formoterol fumarate and roxithromycin effects on muscle mass in an animal model of cancer cachexia. *Oncol rep*. 2008;19(5):1113-21.

Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Muñoz-Canoves P. Macrophage plasticity and the role of Inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm*. 2013;491497.

Kim YS, Sainz RD, Molenaar P, Summers RJ. Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in rat skeletal muscles. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(9):1783-9.

Kim HK, Della-Fera MA, Hausman DB, Baile CA. Effect of clenbuterol on apoptosis, adipogenesis, and lipolysis in adipocytes. *J Physiol Biochem*. 2010;66(3):197-203.

Kim SK, Kong CS. Anti-adipogenic effect of dioxinodehydroeckol via AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. *Chem Biol Interact*. 2010;186:24-9.

Kjaer M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*. 2004;84:649-98.

Kline WO, Panaro FJ, Yang H, Bodine SC. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J Appl Physiol*. 2007;102(2):740-7.

Kollias HD, McDermott JC. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2008;104(3):579-87.

Koopman R, Gehrig SM, Léger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, Lynch GS. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic {beta}-adrenoceptor stimulation in mice. *J Physiol*. 2010;588(Pt 23):4811-23.

Kovanen V. Intramuscular extracellular matrix: Complex environment of muscle cells. *Exerc Sport Sci Rev*. 2002;30:20-5.

Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*. 2008;2:22-31.

Kwak KB, Chung SS, Kim OM, Kang MS, Ha DB, Chung CH. Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1175(3):243-9.

Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down regulating MyoD expression. *J Biol Chem*. 2002;277:49831-40.

Lebrasseur NK, Walsh K, Arany Z. Metabolic benefits of resistance training and fast glycolytic skeletal muscle. *Am J Physiol. Endocrinol Metab*. 2011;300:E3-10.

Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*. 2004;18:39-51.

Lefaucheur JP, Sebillé A. Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta 1 or insulin-like growth factor I. *J Neuroimmunol*. 1995;57(1-2):85-91.

Lefaucheur JP, Gjata B, Lafont H, Sebillé A. Angiogenic and inflammatory responses following skeletal muscle injury are altered by immune neutralization of endogenous basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *J Neuroimmunol*. 1996;70:37-44.

Leineweber K, Heusch G. Beta 1- and beta 2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol*. 2009;158:61-9.

Li Y, Huard J. Differentiation of muscle-derived cells into myofibroblasts in injured skeletal muscle. *Am J Pathol*. 2002;161:895-907.

Li YP. TNF- α is a mitogen in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;285:C370-76.

Li H, Chen J, Chen S, Zhang Q, Chen S. Antifibrotic Effects of Smad4 Small Interfering RNAs in Injured Skeletal Muscle After Acute Contusion. *Int J Sports Med*. 2011;32(10):735-42.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002. xii, 369 p.

Lijnen HR, van Hoef B, Lupu F, Moons L, Carmeliet P, Collen D. Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1035-45.

Liu HM. The role of extracellular matrix in peripheral nerve regeneration: a wound chamber study. *Acta Neuropathol*. 1992;83:469-74.

Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol*. 2013;120:163-84.

Loell I, Lundberg IE. Can muscle regeneration fail in chronic inflammation: a weakness in inflammatory myopathies? *J Intern Med*. 2011;269(3):243-57.

Lopez-Illasaca M, Li W, Uren A, Yu JC, Kazlauskas A, Gutkind JS, Heidaran MA. Requirement of phosphatidylinositol-3 kinase for activation of JNK/SAPKs by PDGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232(2):273-7.

Louis CA, Mody V, Henry WL, Reichner JS, Albina JE. Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages. *Am J Physiol*. 1999;276:R237-42.

Louis SN, Jackman GP, Nero TL, Iakovidis D, Louis WJ. Role of beta-adrenergic receptor subtypes in lipolysis. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2000;14(6):565-77.

Lynch GS, Ryall JG. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev*. 2008;88(2):729-67.

Lynch GS. Sarcopenia - age-related muscle wasting and weakness: mechanism and treatments. new york: Springer. 2011.

Macintosh BR, Gardiner PF, McComas AJ. Skeletal muscle: form and function. Champaign, IL: Human Kinetics. 2006. viii, 423 p.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25:677-86.

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229:176-85.

Marette A, Bukowiecki LJ. Mechanism of norepinephrine stimulation of glucose transport in isolated rat brown adipocytes. *Int J Obes*. 1990;14:857-67.

Marimuthu K, Murton AJ, Greenhaff PL. Mechanisms regulating muscle mass during disuse atrophy and rehabilitation in humans. *J Appl Physiol*. 2011;110(2):555-60.

Marshall A, Salerno MS, Thomas M, Davies T, Berry C, Dyer K, et al. Mighty is a novel promyogenic factor in skeletal myogenesis. *Exp Cell Res*. 2008;314(5):1013-29.

Mathieu O, Cruz-Orive LM, Hoppeler H, Weibel ER. Measuring error and sampling variation in stereology: comparison of the efficiency of various methods for planar image analysis. *J Microsc*. 1981;121(Pt 1):75-88.

Matsakas A, Patel K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol*. 2009;24(5):611-29.

Mayer U. Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem*. 2003;278(17):14587-90.

McCormick C, Alexandre L, Thompson J, Mutungi G. Clenbuterol and formoterol decrease force production in isolated intact mouse skeletal muscle fiber bundles through a beta2-adrenoceptor-independent mechanism. *J Appl Physiol.* 2010;109(6):1716-27.

McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol.* 2003;162:1135-47.

McFarlane C, Hennebry A, Thomas M, Plummer E, Ling N, Sharma M, Kambadur R. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp Cell Res.* 2008;314:317-29.

McLennan IS, Koishi K. The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *Int J Dev Biol.* 2002;46(4):559-67.

Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve.* 1999;22:724-32.

Mendler L, Zador E, Ver Heyen M, Dux L, Wuytack F. Myostatin levels in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. *J Muscle Res Cell Motil.* 2000;21:551-63.

Michele DE, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem.* 2003;278(18):15457-60.

Mikkelsen UR, Gissel H, Fredsted A, Clausen T. Excitation-induced cell damage and beta2-adrenoceptor agonist stimulated force recovery in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(2):R265-72.

Miyabara EH, Martin JL, Griffin TM, Moriscot AS, Mestril R. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse attenuates skeletal muscle damage induced by cryolesioning. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(4):C1128-38.

Miyabara EH, Conte TC, Silva MT, Baptista IL, Bueno C Jr, Fiamoncini J, et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 is involved in differentiation of regenerating myofibers in vivo. *Muscle Nerve.* 2010;42(5):778-87.

Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat.* 1965;99(3):435-44.

Murga C, Fukuhara S, Gutkind JS. A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J Biol Chem.* 2000;275(16):12069-73.

Murphy KT, Cobani V, Ryall JG, Ibebunjo C, Lynch GS. Acute antibody-directed myostatin inhibition attenuates disuse muscle atrophy and weakness in mice. *Journal Applied Physiol.* 2011a;110(4):1065-72.

Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development*. 2011b;138:3625-37.

Nader GA, McLoughlin TJ, Esser KA. mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2005;289(6):C1457-65.

Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Catecholamines inhibit Ca(2+)-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(3):E449-54.

Navegantes LC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I. Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(3):281-6.

Nguyen HX, Lusic AJ, Tidbal JG. Null mutation of myeloperoxidase in mice prevents mechanical activation of neutrophil lysis of muscle cell membranes in vitro and in vivo. *J Physiol*. 2005;565:403-13.

Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H. Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve*. 1991;14(6):515-20.

Osman B, Doller A, Akool el-S, Holdener M, Hintermann E, Pfeilschifter J, Eberhardt W. Rapamycin induces the TGFbeta1/Smad signaling cascade in renal mesangial cells upstream of mTOR. *Cell Signal*. 2009;21(12):1806-17.

Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Di Lucia P, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, et al. β 2-Agonists Prevent Th1 Development by Selective Inhibition of Interleukin 12. *J Clin Invest*. 1997;100:1513-9.

Pagnon J, Matzaris M, Stark R, Meex RC, Macaulay SL, Brown W, et al. Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase. *Endocrinology*. 2012;153:4278-89.

Pearen MA, Ryall JG, Lynch GS, Muscat GE. Expression profiling of skeletal muscle following acute and chronic beta2-adrenergic stimulation: implications for hypertrophy, metabolism and circadian rhythm. *BMC Genomics*. 2009;10:448.

Pehme A, Alev K, Kaasik P, Julkunen A, Seene T The effect of mechanical loading on the MyHC synthesis rate and composition in rat plantaris muscle. *Int J Sports Med*. 2004;25(5):332-8.

Pereira MG, Baptista IL, Carllassara EO, Moriscot AS, Aoki MS, Miyabara EH. Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. *PLoS One*. 2014;9:e85283.

Peters SJ, Dyck DJ, Bonen A, Spriet LL. Effects of epinephrine on lipid metabolism in resting skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1998;275(2)Pt 1:E300-9.

Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tec*. 2000;50(6):500-9.

Pette D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2001;90(3):1119-24.

Perdiguerio E, Kharraz Y, Serrano AL e Munoz-Canoves P. MKP-1 coordinates ordered macrophage phenotype transitions essential for stem cell-dependent tissue repair. *Cell Cycle*. 2012;11(5),877–86.

Pizza FX, Koh TJ, McGregor SJ, Brooks SV. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *J Appl Physiol*. 2002;92(5):1873-8.

Pullar CE, Manabat-Hidalgo CG, Bolaji RS, Isseroff RR. beta-Adrenergic receptor modulation of wound repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):158-64.

Reiken S, Lacampagne A, Zhou H, Kherani A, Lehnart SE, Ward C, et al. PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol*. 2003;160(6):919-28.

Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:C993-9.

Roberts P, Mcgeachie JK. The effects of clenbuterol on satellite cell activation and the regeneration of skeletal muscle: an autoradiographic and morphometric study of whole muscle transplants in mice. *J Anat*. 1992;180(Pt1):57-65.

Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*. 2001;3(11):1009-13.

Rosen GD, Sanes JR, LaChance R, Cunningham JM, Roman J, Dean DC. Roles of the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell*. 1992;69:1107-19.

Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, Kirstetter P, Lopez RG, Rosenthal N, et al. A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106:17475-80.

Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283(6):R1386-94.

Ryall JG, Plant DR, Gregorevic P, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *J Physiol*. 2004;555:175-88.

Ryall JG, Sillence MN, Lynch GS. Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *Br J Pharmacol*. 2006;147(6):587-95.

Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. Attenuation of age-related muscle wasting and weakness in rats after formoterol treatment: therapeutic implications for sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007;62(8):813-23.

Ryall JG, Lynch GS. The potential and the pitfalls of beta-adrenoceptor agonists for the management of skeletal muscle wasting. *Pharmacol Ther*. 2008;120(3):219-32.

Ryall JG, Schertzer JD, Lynch GS. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontol*. 2008a;9(4):213-28.

Ryall JG, Schertzer JD, Alabakis TM, Gehrig SM, Plant DR, Lynch GS. Intramuscular beta2-agonist administration enhances early regeneration and functional repair in rat skeletal muscle after myotoxic injury. *J Appl Physiol*. 2008b;105:165-72.

Ryall JG, Church JE, Lynch GS. Novel role for β -adrenergic signalling in skeletal muscle growth, development and regeneration. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(3):397-401.

Saclier M, Cuvelier S, Magnan M, Mounier R, Chazaud B. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. *FEBS J*. 2013;280(17):4118-30.

Saksela O, Laiho M. Growth factors and the extracellular matrix. *Duodecim*. 1990;06:297-306.

Salerno MS, Dyer K, Bracegirdle J, Platt L, Thomas M, Siriett V, Kambadur R, Sharma M. Akirin1 (Mighty) a novel promyogenic factor regulates muscle regeneration and cell chemotaxis. *Exp Cell Res*. 2009;315(12):2012-21.

Salvini TF, Morini CC, Selistre de Araújo HS, Ownby CL. Long-term regeneration of fast and slow murine skeletal muscles after induced injury by ACL myotoxin isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* (broad-banded copperhead) venom. *Anat Rec*. 1999;254(4):521-33.

Salvini TF, Belluzzo SS, Selistre de Araújo HS, Souza DH. Regeneration and change of muscle fiber types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from *Agkistrodon contortrix laticinctus* venom. *Toxicon*. 2001;39(5):641-9.

Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol*. 2010;199:451-63.

Schoenfeld BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res*. 2010;24(10):2857-72.

Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1994;123:213-57.

Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol.* 2000;218:115-24.

Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardi M, Munoz-Canoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 2008;7:33-44.

Shimizu Y, Kielar D, Minokoshi Y, Shimazu T. Noradrenaline increases glucose transport into brown adipocytes in culture by a mechanism different from that of insulin. *Biochem J.* 1996;314(Pt2):485-90.

Silva LH, Silva MT, Gutierrez RM, Conte TC, Toledo CA, Aoki MS, et al. GaAs 904-nm laser irradiation improves myofiber mass recovery during regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin. *Lasers Med Sci.* 2012;27(5):993-1000.

Silva MT, Wensing LA, Brum PC, Câmara NO, Miyabara EH. Impaired structural and functional regeneration of skeletal muscles from β 2-adrenoceptor knockout mice. *Acta Physiol (Oxf).* 2014; doi: 10.1111/apha.12329. [Epub ahead of print]

Silvina Lo Presti M, Walter Rivarola H, Bustamante JM, Fernández AR, Enders JE, Levin G, et al. Some components of the cardiac β -adrenergic system are altered in the chronic indeterminate form of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Parasitol.* 2008;38(13):1481-92.

Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med.* 2008;38(11):947-69.

Smith LR, Meyer G, Lieber RL. Systems analysis of biological networks in skeletal muscle function. *WIREs Syst Biol Med.* 2013;5:55-71.

Sneddon AA, Delday MI, Steven J, Maltin CA. Elevated IGF-II mRNA and phosphorylation of 4E-BP1 and p70(S6k) in muscle showing clenbuterol-induced anabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(4):E676-82.

Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol.* 2000;204:19-28.

Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, et al. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299:E1016-27.

Stauber WT, Knack KK, Miller GR, Grimmer JG. Fibrosis and intercellular collagen connections from four weeks of muscle strain. *Muscle Nerve.* 1996;19:423-30.

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992;176:287-92.

Sugita M, Sugita H, Kim M, Mao J, Yasuda Y, Habiro M, et al. Inducible nitric oxide synthase deficiency ameliorates skeletal muscle insulin resistance but does not alter unexpected lower blood glucose levels after burn injury in C57BL/6 mice. *Metabolism*. 2011;61:127-36.

Sunada Y, Campbell KP. Dystrophin-glycoprotein complex: molecular organization and critical roles in skeletal muscle. *Curr Opin Neurol*. 1995;8(5):379-84.

Szalay K, Razga Z, Duda E. TNF inhibits myogenesis and downregulates the expression of myogenic regulatory factors myoD and myogenin. *Eur J Cell Biol*. 1997;74:391-8.

Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*. 2000;10(6):321-5.

Tasken K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*. 2004;84:137-67.

Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH Jr, Kull FC Jr, Gonzalez-Cadavid N. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280:E221-8.

Teixeira CF, Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Hofling MA, et al. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve*. 2003;28:449-59.

Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cellular Physiol*. 2010;224:7-16.

Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27:1022-32.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R345-53.

Tidball JG, Spencer MJ. Calpains and muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32:1-5.

Tidball JG, Spencer MJ. Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *J Physiol*. 2002;545(Pt3):819-28.

Tidball JG, Wehling-Henricks M. Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol*. 2007;578:327-36.

Tiidus PM. Skeletal muscle damage and repair. Champaign, IL: Human Kinetics. 2008. xiii, 337 p.

Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296(6):C1258-70.

Tsujioka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Suzuki K, et al. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996;97:244-9.

Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Suelves M, Ardite E, De Mori R, et al. Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGFbeta/alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev*. 2008;22:1747-52.

Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2009;18(3):482-96.

Villalta SA, Deng B, Rinaldi C, Wehling-Henricks M, Tidball JG. IFN- γ promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J Immunol*. 2011;187:5419-28.

Voltarelli VA, Bacurau AV, Bechara LR, Bueno CR Jr, Bozi LH, Mattos KC, Salemi VM, Brum PC. Lack of β 2-AR improves exercise capacity and skeletal muscle oxidative phenotype in mice. *Scand J Med Sci Sports*. 2012;22(6):e125-32.

Wang X, Wu H, Zhang Z, Liu S, Yang J, Chen X, Fan M. Effects of interleukin-6, leukemia inhibitory factor, and ciliary neurotrophic factor on the proliferation and differentiation of adult human myoblasts. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;28:113-24.

Wang H, Melton DW, Porter L, Sarwar ZU, McManus LM, Shireman PK. Altered macrophage phenotype transition impairs skeletal muscle regeneration. *Am J Pathol*. 2014;184(4):1167-84.

Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J*. 2002;16:1630-2

Wehling-Henricks M, Jordan MC, Gotoh T, Grody WW, Roos KP, Tidball JG. Arginine metabolism by macrophages promotes cardiac and muscle fibrosis in mdx muscular dystrophy. *PLoS One*. 2010;5:e10763.

Wei B, Jin JP. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. *Arch Biochem Biophys*. 2011;505(2):144-54.

Wernig A, Salvini TF, Langenfeld-Oster B, Irintchev A; Dorlöchter M. Plasticity of Motoneuronal Connections. 1991; 5-100 p. (Endplate and motor unit remodeling in vertebrate muscles)

Williams RS, Caron MG, Daniel K. Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. *Am J Physiol*; 1984;246(2):E160-7.

Wozniak AC, Kong J, Bock E, Pilipowicz O, Anderson JE. Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle Nerve*. 2005; 31(3):283-300.

Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 2010;30(3):245-57.

Yamanouchi K, Soeta C, Naito K, Tojo H. Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270:510-6.

Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(21):4117-30.

Zhang J, He Q, Liu QY, Guo W, Deng XM, Zhang WW, et al. Differential gene expression profile in pig adipose tissue treated with/without clenbuterol. *BMC Genomics*. 2007;26:433.

Zhang W, Fievez L, Cheu E, Bureau F, Rong W, Zhang F, et al. Anti-inflammatory effects of formoterol and ipratropium bromide against acute cadmium-induced pulmonary inflammation in rats. *Eur J Pharmacol*. 2010;628(1-3):171-8.

Zhong H, Guerrero SW, Esbenshade TA, Minneman KP. Inducible expression of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat C6 glioma cells: functional interactions between closely related subtypes. *Mol Pharmacol*. 1996;50:175-84.

Zhu X, Topouzis S, Liang LF, Stotish RL. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine*. 2004;26(6):262-72.