LUCILA HERNANDES DA SILVA

EFEITO DO AGONISTA B₂-ADRENÉRGICO
FORMOTEROL NA REGENERAÇÃO MUSCULAR
DE RATOS IDOSOS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Morfofuncionais Departamento de
Anatomia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

LUCILA HERNANDES DA SILVA

EFEITO DO AGONISTA B₂-ADRENÉRGICO
FORMOTEROL NA REGENERAÇÃO MUSCULAR
DE RATOS IDOSOS

Dissertação apresentada ao Departamento
de Anatomia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Ciências
Morfofuncionais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elen Haruka
Miyabara

Versão Original

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, Lucila Hemandes da.

Efeito do agonista β_2 -adrenérgico formoterol na regeneração muscular de ratos idosos / Lucila Hemandes da Silva. – São Paulo, 2011.

Orientador: Elen Haruka Miyabara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Plasticidade músculo-esquelética.

Versão do título para o inglês: Effect of the β_2 -adrenoceptor agonist formoterol on skeletal muscle regeneration of aged rats

Descritores: 1. Músculo esquelético 2. Regeneração
3. Envelhecimento 4. Adrenonoceptores I. Miyabara, Elen Haruka
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0207/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucila Hernandes da Silva.

Título da Dissertação: Efeito do agonista β_2 -adrenérgico formoterol na regeneração muscular de ratos idosos.

Orientador(a): Elen Haruka Miyabara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **132** nas fls. **63** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Elen Haruka Miyabara, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Aspectos estruturais e moleculares da lesão e da regeneração muscular esquelética**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Talita Cristiane Conte, Lygia Samartin Gonçalves os pesquisadores Anselmo Sigari Moriscot, Antonio Carlos Oliveira, Marcelo Saldanha Aoki** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **15.12.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 16 de dezembro de 2008.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.026.09

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 132/08/CEEA datado de 15.12.08, por solicitação da Profa. Dra. ELEN HARUKA MIYABARA, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão dos alunos **Lucila Hernandes da Silva e Meiricris Tomaz Silva** ao projeto de pesquisa "*Aspectos estruturais e moleculares da lesão e da regeneração muscular esquelética*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 21 de maio de 2009.

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

Aos meus pais pelo apoio e incentivo durante toda a minha
trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Elen Haruka Miyabara, pela paciência e por todos os ensinamentos que foram de grande importância para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus companheiros de laboratório Talita, Tábata, Meiricris, Marcelo, Eduardo, Thiago e Débora por toda a ajuda que foi essencial para a execução desse projeto e por todos os momentos descontraídos e divertidos que passamos juntos.

Ao Professor Anselmo Sigari Moriscot e equipe por disponibilizar seu laboratório bem como os equipamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento de parte dos experimentos.

Ao Professor Toninho e à técnica Carmen por disponibilizar o equipamento de contração e pelo auxílio no manuseio deste e na análise dos resultados.

Ao professor Rui Curi e equipe por possibilitar o desenvolvimento dos experimentos de síntese protéica em seu laboratório.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Anatomia que estiveram envolvidos indiretamente durante todo este processo, mas que certamente contribuíram para o desenvolvimento desse projeto.

Aos meus pais por todo o investimento financeiro, por acreditarem no meu potencial e por todos os valores que me transmitiram ao longo de toda minha vida.

Aos meus familiares e amigos por todas as demonstrações de carinho e incentivo durante a realização desse projeto.

Ao Luiz pela compreensão, companheirismo e pelos momentos felizes que me motivaram.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por todo o apoio financeiro.

RESUMO

Silva LH. Efeito do agonista β_2 -adrenérgico formoterol na regeneração muscular de ratos idosos. [dissertação (Mestrado em Ciências)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Músculos esqueléticos de ratos idosos apresentam uma reduzida capacidade de se regenerar após lesão. No presente estudo, nós lançamos a hipótese de que a estimulação farmacológica de adrenoceptores β_2 em músculos de ratos idosos lesados poderia melhorar a regeneração destes. Ratos jovens e idosos foram tratados com injeção subcutânea do agonista β_2 -adrenérgico formoterol (2 $\mu\text{g/kg/dia}$) durante 10 e 21 dias após lesão do músculo sóleo. Os músculos de ratos idosos lesados e tratados com formoterol por 10 e 21 dias apresentaram menor processo inflamatório e fibras musculares em regeneração com maior calibre quando comparados aos músculos apenas lesados. O tratamento com formoterol preveniu a queda da força tetânica e aumentou a síntese de proteínas e a fosforilação de mTOR em músculos de ratos idosos lesados e avaliados após 10 dias. Nossos resultados sugerem que o formoterol melhora a capacidade regenerativa estrutural e funcional dos músculos esqueléticos de ratos idosos, e que esse efeito é mediado pelo aumento da síntese protéica através da ativação de mTOR.

Palavras-chave: Músculo esquelético. Regeneração. Envelhecimento. Adrenoceptores.

ABSTRACT

SILVA LH. Effect of the β_2 -adrenoceptor agonist formoterol on skeletal muscle regeneration of aged rats [Masters thesis (Science)] - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2011.

Skeletal muscles from old rats fail to completely regenerate following injury. In the present work, we hypothesized that pharmacological stimulation of β_2 -adrenoceptors in aged muscles following injury could improve their regenerative capacity. Young and aged rats were treated with a subcutaneous injection of β_2 -adrenergic agonist formoterol (2 $\mu\text{g/kg/day}$) up to 10 and 21 days after soleus muscle injury. Formoterol-treated muscles from old rats evaluated at 10 and 21 days post-injury showed reduced inflammation and regenerating myofibers of greater caliber when compared to their injured controls. Formoterol minimized the decrease in tetanic force and increased protein synthesis and mTOR phosphorylation in old muscles at 10 days post-injury. Our results suggest that formoterol improves structural and functional regenerative capacity of regenerating skeletal muscles from aged rats by increasing protein synthesis via mTOR activation.

Key words: Skeletal muscle. Regeneration. Aging. Adrenoceptor.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP –adenosina trifosfato

FGF – fator de crescimento de fibroblasto

TGF- fator de crescimento e transformação

HGF – fator de crescimento de hepatócito

NO – óxido nítrico

IGF - I- insulin-like growth factor I (fator semelhante a insulina-I)

IGF – II- insulin-like growth factor II

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

MRF - fator regulatório miogênico

MyoD – fator de determinação miogênica

Myf5 – fator miogênico 5

MRF4 – fator regulatório miogênico 4

TNF α – fator alfa de necrose tumoral

mTOR – mammalian target of rapamycin

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

S6K – 70 kDa ribosomal protein S6 kinase

AC – adenilil ciclase

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

PKA – proteína quinase A

PI3K – fosfatidilinositol 3 quinase

PKB – proteína quinase B (AKT)

PIP2 – fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3 – fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

raptor – proteína associada regulatória de mTOR

GβL – Gprotein β-subunit-like protein

eIF4E – fator de iniciação eucariótico 4E

GSK3β – glicogênio sintase quinase 3β

FOXO – forkhead Box O transcription factor (fator de transcrição forkhead Box O)

muRF-1 – muscle-specific RING finger 1

C – controle

F 10d – tratado com formoterol por 10 dias

F 21d – tratado com formoterol por 20 dias

Crio 10d – criolesado e avaliado após 10 dias

Crio 21d – criolesado e avaliado após 21 dias

Crio+F10d – criolesado tratado com formoterol por 10 dias

Crio+F21d – criolesado tratado com formoterol por 21 dias

PC – peso corporal

PM – peso muscular

PCç – peso do coração

ANOVA – análise de variância

AST – área de secção transversal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação dos elementos da via de sinalização β_2 -adrenérgica localizados no sarcolema	24
Figura 2 - Representação da via de sinalização β_2 -adrenérgica: $G\alpha_s$ -AC-AMPc.....	25
Figura 3 - Representação da via de sinalização β_2 -adrenérgica: PI3K/AKT	27
Figura 4 - Esquema representativo da via ubiquitina-proteassoma	28
Figura 5a - Secções transversais de músculo sóleo de ratos jovens corados com azul de toluidina	43
Figura 5b - Secções transversais de músculo sóleo de ratos idosos corados com azul de toluidina	44
Figura 6a - Área de secção transversal das fibras musculares de músculos sóleo de ratos jovens e idosos analisados em 10 dias após criolesão	45
Figura 6b - Área de secção transversal das fibras musculares de músculos sóleo de ratos jovens e idosos analisados em 21 dias após criolesão	46
Figura 7a - Comparação da força tetânica máxima dos animais jovens e idosos	47
Figura 7b - Comparação da força específica (mN / mm^2) dos animais jovens e idosos	48
Figura 8 - <i>In vitro</i> efeito do formoterol na síntese de proteínas do músculo esquelético de ratos jovens e idosos.....	49
Figura 9 - Conteúdo de AMPc dos músculos soleus tratados com formoterol e analisados 10 dias depois da criolesão de ratos jovens e idosos	50
Figura 10 - Expressão de mTOR fosforilado e total em músculos jovens e idosos	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre peso corporal, peso muscular e peso do coração dos ratos jovens e idosos.....	40
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Características gerais do tecido muscular esquelético	15
1.2 Regeneração do músculo esquelético	18
1.3 Efeitos do envelhecimento na musculatura esquelética e suas repercussões sobre o processo regenerativo muscular	20
1.4 Adrenoceptores β_2 no músculo esquelético.....	22
1.5 Justificativa e Relevância do estudo	31
2 OBJETIVO.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Animais.....	33
3.2 Grupos experimentais	33
3.3 Protocolo de criolesão	34
3.4 Tratamento com formoterol	34
3.5 Histologia.....	34
3.6 Mensuração da contração muscular.....	35
3.7 Ensaio de incorporação de aminoácidos.....	36
3.8 Mensuração do conteúdo de AMP _c tecidual.....	36
3.9 Anticorpos para Western blot.....	37
3.10 Western blot	37
3.11 Análises morfométricas.....	38
3.12 Análises estatísticas	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Efeito do tratamento com formoterol no peso corporal, peso cardíaco e peso muscular de ratos idosos.....	39
4.2 Efeito do formoterol em aspectos histológicos do músculo sóleo em regeneração	40
4.3 Efeito do formoterol sobre a função contrátil do músculo sóleo em regeneração de ratos idosos	46
4.4 Efeito do formoterol em aspectos moleculares do músculo sóleo em regeneração	48
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do tecido muscular esquelético

O tecido muscular esquelético corresponde de 40 a 60% de toda a massa corporal, é responsável pela sustentação e movimento coordenado do corpo, além de auxiliar na manutenção da união das peças ósseas e na determinação de posições e postura do esqueleto (Junqueira e Carneiro, 2008; Lieber, 2002; Ten Broek et al., 2010). O músculo esquelético é composto por feixes de células de formato poligonal e alongado sendo denominadas de fibras musculares. As fibras musculares são originadas através da fusão de mioblastos e devido a isso são multinucleadas, sendo que os seus núcleos estão localizados em sua periferia (Grefte et al., 2007; Junqueira e Carneiro, 2008). As fibras musculares são organizadas em grupos de feixes (fascículos), e são envolvidas por três camadas de tecido conjuntivo: epimísio, perimísio e endomísio. O epimísio envolve todo o músculo esquelético, o perimísio envolve os fascículos e cada fibra muscular é circundada pelo endomísio, o qual é formado pela lâmina basal da fibra muscular associada a fibras reticulares, deste modo o tecido conjuntivo tem a função de manter unidas as fibras musculares, permitindo que a contração gerada por cada fibra muscular ocorra de forma homogênea e seja transmitida para os tendões e ossos (Grefte et al., 2007; Junqueira e Carneiro, 2008).

O citoplasma da fibra muscular é preenchido por miofibrilas que são estruturas cilíndricas de cerca de 1 a 2 μm de diâmetro (Junqueira e Carneiro, 2008). As miofibrilas estão dispostas ao longo de toda fibra muscular e apresentam um padrão de estriamento devido à presença de bandas claras e escuras alternadas. As bandas claras são denominadas de bandas I, isotrópicas, enquanto as escuras denominam-se bandas A, anisotrópicas (Junqueira e Carneiro, 2008; MacIntosh et al., 2006). No centro de cada banda A, observa-se uma banda H e no centro de cada banda I, nota-se uma linha transversal escura, a linha Z (Junqueira e Carneiro, 2008; MacIntosh et al., 2006). A região entre duas linhas Z é denominada de sarcômero, a unidade funcional contrátil do músculo esquelético (Lieber, 2002). Os sarcômeros são formados por miofilamentos contráteis, cujos principais são: actina, miosina, troponina e tropomiosina (Junqueira e Carneiro, 2008). A actina é um filamento fino que apresenta uma estrutura helicoidal formado por duas cadeias simples de monômeros torcidas uma sobre a outra, em hélice dupla (Junqueira e Carneiro, 2008). Os filamentos de actina estão localizados

perpendicularmente em cada lado da linha Z, apresentando polaridades opostas, e se estendem até a semibanda A (Junqueira e Carneiro, 2008; MacIntosh et al., 2006). A miosina é o filamento mais espesso presente no sarcômero e está localizada na banda anisotrópica (Junqueira e Carneiro, 2008; MacIntosh et al., 2006). A estrutura molecular da miosina compreende duas porções principais: a cabeça globular em que há sítios de ligação para 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 garante a interação da miosina com a actina (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 às várias moléculas de troponina (Tn) que também está localizada ao longo do filamento de actina (Lieber, 2002; MacIntosh et al., 2006). A Tn é formada por três subunidades que são denominadas de acordo com os compostos que estas interagem ou com as funções que estas exercem: a troponina-T (Tn-T) liga a troponina à tropomiosina e forma o complexo troponina-tropomiosina, a troponina-C (Tn-C) que tem afinidade pelos íons cálcio e a troponina-I (Tn-I) que se liga à actina quando não há cálcio presente, assim, exercendo uma função inibitória à interação da tropomiosina com a actina (Ferrante et al., 2011; MacIntosh et al., 2006; Schoenfeld, 2010; Wei e Jin, 2011). A contração muscular é controlada pelo sistema nervoso central através da unidade motora que é constituída pela célula nervosa especializada (o neurônio motor) e as fibras musculares que esta inerva (Lieber, 2002; MacIntosh et al., 2006). O neurônio motor é composto por corpo celular (*soma*), dendritos que recebem sinais de outros neurônios, e os axônios que enviam impulsos nervosos (potenciais de ação) para as fibras musculares e assim, desencadeiam a contração muscular (Lieber, 2002; MacIntosh et al., 2006). O potencial de ação é caracterizado pela despolarização do neurônio motor que inerva as fibras musculares. A despolarização consiste na entrada de íons de sódio (Na^+) no meio intracelular, conseqüentemente ocorre a inversão da polaridade da célula que torna o seu meio intracelular positivo e o extracelular negativo (MacIntosh et al., 2006). O neurônio motor despolarizado secreta neurotransmissores, tais como acetilcolina, que se ligam aos seus receptores pós-sinápticos localizados no sarcolema das fibras musculares, essa ligação acarreta na despolarização também do sarcolema das fibras musculares e na propagação do potencial de ação ao longo das fibras musculares (Lieber, 2002).

A condução do potencial de ação nas fibras musculares induz a liberação de cálcio presente no retículo sarcoplasmático para o meio intracelular (Lieber, 2002). O cálcio liberado se associa à troponina, alterando o complexo troponina-tropomiosina, assim a tropomiosina é empurrada para dentro da hélice de actina (Lieber, 2002; MacIntosh et al., 2006). Desta forma, a actina fica disponível para interagir com a cabeça das moléculas de miosina. A miosina se liga fortemente à actina, e ocorre o deslizamento da actina sobre a miosina, acarretando no encurtamento do sarcômero (Junqueira e Carneiro, 2008). Quando o impulso nervoso cessa, o cálcio é bombeado de volta para o retículo sarcoplasmático pela ação da ATPase (proteína presente na membrana do retículo sarcoplasmático) com o gasto de energia, consequentemente a interação da actina com a miosina é desfeita, acarretando no relaxamento da fibra muscular (Lieber, 2002).

Apesar das fibras musculares possuírem as mesmas características básicas anteriormente mencionadas, elas possuem diferentes propriedades contráteis e metabólicas, e dessa forma, 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 e IIb (Lieber, 2002; MacIntosh et al., 2006). Fibras musculares do tipo I são de contração lenta, possuem uma alta vascularização, maior quantidade de mitocôndrias e de mioglobina, além de um metabolismo oxidativo que lhes garantem maior resistência à fadiga (Ciciliot e Schiaffino, 2010; Lieber, 2002). Enquanto que as fibras musculares do tipo IIb são de contração rápida, possuem menor vascularização, menor quantidade de mitocôndrias e mioglobina, o metabolismo é predominantemente glicolítico, sendo assim, são menos resistentes à fadiga (Ciciliot e Schiaffino, 2010). As fibras musculares que apresentam características intermediárias a esses dois tipos de fibras são as do tipo IIa que possuem uma quantidade moderada de mitocôndrias e mioglobinas, e seu metabolismo é misto, sendo ambos os metabolismos importantes nesta fibra muscular (Ciciliot e Schiaffino, 2010; Lieber, 2002; MacIntosh et al., 2006).

O músculo esquelético possui uma notável capacidade em se adaptar a diferentes situações (Karagounis e Hawley, 2010; LeBrasseur et al., 2011; Pette e Staron, 2000). Quando há ausência ou diminuição de mobilidade muscular, como por exemplo, em situações de imobilização ou longos períodos de repouso em leito, ocorre atrofia do músculo esquelético que é caracterizada pela redução da massa muscular indicada pela diminuição da área de secção transversal das fibras musculares e consequente diminuição da força muscular (Cassano et al., 2009; Jackman e Kandarian, 2004;

Lieber, 2002; Murphy et al., 2011). Na ocorrência de estímulos que exigem uma maior demanda do músculo esquelético, como por exemplo, a sobrecarga mecânica induzida pelo treinamento de força (Matsakas e Patel, 2009; Schoenfeld, 2010) ou pela remoção de músculos sinergistas (Pehme et al., 2004), ocorre a hipertrofia muscular que é caracterizada pelo aumento da área de secção transversal das fibras musculares e consequente aumento da força muscular (Matsakas e Patel, 2009; Schoenfeld, 2010). Outra adaptação que o músculo esquelético pode sofrer é a conversão gradual dos tipos de fibras musculares desencadeada pela presença ou ausência de estímulos. Na presença de estímulos como, por exemplo, o treinamento aeróbio as fibras musculares do tipo IIb sofrem conversão gradual em direção às fibras do tipo I; na ausência de estímulos como no caso do desuso do músculo esquelético, as fibras musculares do tipo I sofrem conversão gradual em direção às fibras do tipo IIb, ou seja, tornam-se menos resistentes à fadiga (Tiidus, 2008). Frente a uma lesão, o músculo esquelético também apresenta uma resposta adaptativa na tentativa de recuperar a sua estrutura e função acometidas. Esse processo é denominado regeneração muscular e será caracterizado a seguir.

1.2 Regeneração do músculo esquelético

O processo de regeneração muscular esquelética é desencadeado a partir de um estímulo lesivo que pode ser de natureza: química, como, por exemplo, toxinas de serpentes (Conte et al., 2008; Salvini et al., 2001); mecânica, como no caso de distensões ou lacerações durante a atividade física (Jarvinen et al., 2005); térmica como, por exemplo, a exposição do músculo esquelético a altas temperaturas o que pode causar queimadura (Sugita et al., 2011) ou a baixas temperaturas o que pode causar congelamento (Baptista et al., 2011; Miyabara et al., 2010). Após o processo lesivo, ocorre a ruptura do sarcolema da fibra muscular e aumento da permeabilidade celular (Grefte et al., 2007; Jarvinen et al., 2005). A mudança na permeabilidade do sarcolema acarreta no aumento do influxo de cálcio para o meio intracelular o que desencadeia proteólise cálcio-dependente, que caracteriza a necrose das fibras musculares lesadas (Ciciliot e Schiaffino, 2010; Grefte et al., 2007; Loell e Lundberg, 2011).

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; Jarvinen et al., 2005). As principais células inflamatórias que invadem o local da lesão são neutrófilos e macrófagos (Jarvinen et al.,

2007). Aproximadamente duas horas após a lesão, os neutrófilos começam a chegar ao local da lesão (Tiidus, 2008) e são responsáveis por secretar citocinas pró-inflamatórias, além disso, os neutrófilos 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 um aumento gradual da entrada de macrófagos no sítio da lesão (Smith et al., 2008; Tiidus, 2008). Os macrófagos removem os debris celulares e liberam citocinas que são capazes de ativar as células satélites (Ciciliot e Schiaffino, 2010; Filippin et al., 2011; Serrano e Cánoves, 2010; Smith et al., 2008). As células satélites são células mononucleadas e indiferenciadas e estão localizadas no músculo esquelético adulto em estado quiescente entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular (Grounds e Yablonka-Reuveni, 1993; Muir et al., 1965; Schultz e McCormick, 1994), quando ativadas estas células se proliferam e posteriormente se diferenciam. Ocorre, então, a fusão dessas células à fibra muscular, o que recompõe as fibras musculares lesadas (Hawke e Garry, 2001; Wozniak et al., 2005).

Além das citocinas, outros fatores são responsáveis pela ativação das células satélites, alguns exemplos são o fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor*; FGF), fator de crescimento e transformação (*transforming growth factor*; TGF), neurotransmissores, fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor*; HGF), óxido nítrico (NO) e os 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). A expressão de IGF-I aumenta durante os processos de regeneração e hipertrofia da fibra muscular, e além de ativar as células satélites, o IGF-I 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 pela indução da hipertrofia muscular através da síntese protéica (Ciciliot e 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 e Schiaffino, 2010).

Quando há uma lesão no músculo esquelético, a expressão de MRFs aumenta nas células satélites e sua ativação é controlada principalmente pelos fatores de transcrição Pax3, Pax7 e Myf5 (Grefte et al., 2007). Quando ativadas, as células

satélites apresentam as expressões de MyoD e Myf5 aumentadas, assim essas células se proliferam e aumentam o número de células precursoras (mioblastos) do músculo (Ciciliot e Schiaffino, 2010; Grefte et al., 2007; Tiidus, 2008). A concomitante redução de Pax3 e Pax7 e o aumento dos fatores de transcrição miogenina e MRF4 proporcionam a diferenciação terminal 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 e Schiaffino, 2010; Grefte et al., 2007; Tiidus, 2008).

Com o avanço da idade ocorre perda gradual da massa muscular e um marcante déficit do potencial regenerativo da musculatura esquelética em idosos. Os efeitos do envelhecimento sobre a musculatura esquelética bem como as suas repercussões sobre o processo regenerativo muscular serão abordados a seguir.

1.3 Efeitos do envelhecimento sobre a musculatura esquelética e suas repercussões no processo regenerativo muscular

À medida que a expectativa de vida vem aumentando significativamente nas últimas décadas, torna-se cada vez mais importante aprofundar os conhecimentos a respeito dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no envelhecimento do sistema muscular, cuja integridade é fundamental para a qualidade de vida. Com o avanço da idade ocorre a sarcopenia caracterizada pela diminuição progressiva da massa muscular (aproximadamente 10% de perda a cada 10 anos a partir dos 50 anos) (Buford et al., 2010; Janssen, 2010; Lexell et al., 1988) devido a perda de fibras musculares e a diminuição da área de secção transversal das fibras musculares, principalmente das fibras do tipo II (Degens, 2007; Narici e Maffulli, 2010). A diminuição do número de fibras musculares e da área de secção transversal das fibras restantes tem sido associada à degeneração progressiva dos neurônios motores, principalmente os que inervam as fibras musculares do tipo II (Degens, 2007; Marzetti e Leeuwenburgh, 2006). A apoptose também é outro processo responsável pela perda de fibras do tecido muscular idoso, embora ainda não esteja bem estabelecido qual o real mecanismo desencadeado para contribuição desta na sarcopenia (Buford et al., 2010; Narici e Maffulli, 2010).

A sarcopenia pode ser desencadeada por fatores extrínsecos como a redução da prática da atividade física e diminuição da nutrição. Além disso, a sarcopenia pode ser

causada por fatores intrínsecos caracterizados pelas mudanças celulares e sistêmicas que ocorrem durante o envelhecimento como o aumento do estresse oxidativo que pode levar ao acúmulo de radicais livres (Buford et al., 2010; Lynch, 2011); o aumento de citocinas pró-inflamatórias como o fator alfa de necrose tumoral (tumor necrosis factor alpha, TNF α) que está envolvido no processo de proteólise muscular (Combaret et al., 2009; Ryall et al., 2008a); a redução na produção de hormônios anabólicos como a testosterona, o hormônio de crescimento (growth hormone, GH) e IGF-I (Buford et al., 2010; Ryall e Lynch, 2008) ; a redução da sensibilidade à insulina (Buford et al., 2010; Ryall et al., 2008a) ; e o acúmulo de tecido conjuntivo e de gordura intramuscular (tecidos não contráteis) (Ryall et al., 2008a). Consequentemente, a sarcopenia pode acarretar no déficit de força muscular, limitação de movimento, diminuição da resposta imunológica e aumento da susceptibilidade às lesões (Adamo e Farrar, 2006; Giresi et al., 2005; Newsholme et al., 1996, 2003).

Estudos recentes têm descrito outra característica que a musculatura esquelética idosa apresenta e que pode estar minimamente associada com a sarcopenia, a dinapenia (Clarck e Fielding, 2011; Manini e Clarck, 2011). A dinapenia é caracterizada pela redução da força muscular ao longo da idade que pode estar relacionada a um déficit na ativação neural, além disso, a contração muscular pode estar prejudicada devido às alterações que ocorrem nas proteínas contráteis e aumento da infiltração de tecidos não contráteis (tecido conjuntivo e tecido adiposo) (Clarck e Fielding, 2011; Manini e Clarck, 2011). Esta característica também contribui para que o indivíduo idoso apresente uma redução da mobilidade e uma maior susceptibilidade a lesões, o que diminui a qualidade de vida (Clarck e Fielding, 2011; Manini e Clarck, 2011).

Uma das principais alterações decorrentes do envelhecimento é o declínio da capacidade regenerativa muscular (Grounds, 1998; Welle, 2002), entretanto os mecanismos intracelulares envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente esclarecidos. Têm sido descrito que com o avanço da idade ocorre uma redução gradual do número de células satélites, entretanto há estudos que relatam resultados divergentes a essa informação (Carosio et al., 2011; Ciciliot e Schiaffino, 2010). Além disso, a redução da capacidade regenerativa do idoso tem sido associada a um déficit no potencial proliferativo das células satélites (Ciciliot e Schiaffino, 2010; Schultz e Lipton, 1982), devido à reduzida ativação da via de sinalização Notch (Buford et al., 2010; Conboy et al., 2003; Ryall et al., 2008a), a qual está envolvida na regulação da ativação e proliferação das células satélites e determinação de linhagem celular (Buford

et al., 2010; Conboy e Rando, 2002). A deprimida resposta regenerativa muscular em idosos também está relacionada à diminuição da capacidade de ganho de massa muscular e de hipertrofia (Alway et al., 2002; Faulkner et al., 1990; Pattison et al., 2003). Nesse sentido, a quantidade elevada de citocinas inflamatórias como TNF α promovem a diminuição de hormônios de crescimento como o IGF-I envolvidos com a sinalização de elementos que promovem o aumento de síntese protéica (Degens, 2007). Além disso, tem sido descrito que a minimização do ganho de massa muscular em ratos idosos após sobrecarga mecânica é resultante da ativação prejudicada de elementos pertencentes a vias de tradução, como é o caso da kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) e de seus alvos S6K (70 kDa ribosomal protein S6 kinase) e 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) (Thomson e Gordon, 2006).

Diante do aumento da expectativa de vida e da importância da integridade muscular para a manutenção da qualidade de vida, torna-se cada vez maior o interesse na investigação de estratégias terapêuticas capazes de minimizar os efeitos deletérios do envelhecimento sobre musculatura esquelética. Dessa forma, o estudo de possíveis agentes terapêuticos na atenuação do déficit regenerativo muscular em idosos ainda é pouco explorado. Bons candidatos seriam os agonistas β_2 -adrenérgicos sintéticos, como é o caso, por exemplo, do clenbuterol e do salbutamol e mais recentemente da nova geração de agonistas β_2 como o formoterol e o salmeterol (Ryall et al., 2008b), por serem agentes anabólicos capazes de maximizar a recuperação do tamanho das fibras musculares em regeneração, acarretando na melhora da estrutura e consequente função de músculos jovens.

A seguir, será apresentada uma introdução sobre os receptores β_2 -adrenérgicos no músculo esquelético e os principais efeitos da estimulação β_2 -adrenérgica na musculatura esquelética.

1.4 Adrenoceptores β_2 no músculo esquelético

O sistema nervoso simpático compreende basicamente duas moléculas de sinalização principais, as catecolaminas: adrenalina (epinefrina) e noradrenalina (norepinefrina) (Lynch e Ryall, 2008). A adrenalina é produzida e liberada pelas glândulas adrenais, e a noradrenalina é produzida e liberada também pela adrenal e pelos axônios dos nervos após a estimulação com acetilcolina (Lynch e Ryall, 2008). A ligação de uma dessas moléculas em um adrenoceptor desencadeia uma determinada

resposta, dependendo do subtipo do adrenoceptor ligado (Lynch e Ryall, 2008). Os adrenoceptores foram inicialmente classificados em 2 subgrupos principais, alfa (α) e beta (β) e, atualmente pelo menos 9 subtipos de adrenoceptores são conhecidos (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 e Hasibeder, 2009; Lynch e Ryall, 2008). O músculo esquelético contém maior densidade de adrenoceptores β , em que se predomina o subtipo β_2 , principalmente nos músculos de contração lenta em que há maior densidade desse subtipo quando comparados aos músculos de contração rápida (Beitzel et al., 2004; Lynch, 2011).

Os adrenoceptores pertencem à família de receptores, com 7 domínios transmembrânicos, acoplados à proteína G (*guanine nucleotide-binding G protein-coupled receptor*, família de GPCR), esta última é composta por 3 subunidades ($G\alpha$, $G\beta$, e $G\gamma$) e se localiza no espaço intracelular (Figura 1), sendo capaz de interagir com a região intracelular dos adrenoceptores (Dunser e Hasibeder, 2009; Leineweber e Heusch, 2009; Lynch, 2011; Lynch e Ryall, 2008). As subunidades β e γ da proteína G ($G\beta\gamma$) formam um dímero que permanece ligado à região intracelular da membrana plasmática e a subunidade α da proteína G ($G\alpha$), em seu estado inativo, formam a proteína heterotrimérica $G\alpha\beta\gamma$ (Lynch, 2011; Lynch e Ryall, 2008) (Figura 1). A ativação de um adrenoceptor β_2 através de sua ligação a um agonista, resulta na mudança conformacional de sua região intracelular e na exposição de seus sítios de ligação à proteína G, fazendo com que esta se associe à sua terceira alça intracelular (Figura 2). Esta associação resulta na substituição de um GDP ligado à $G\alpha$ por um GTP, o que consequentemente desencadeia a dissociação da subunidade $G\alpha$ (ligada ao GTP) do dímero $G\beta\gamma$ (Lynch, 2011; Lynch e Ryall, 2008) (Figura 2). A partir daí, ambas $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$, são capazes de ativar diferentes cascatas de sinalização.

Figura 1 - Representação dos elementos da via de sinalização β_2 -adrenérgica localizados no sarcolema.

Adrenoceptor 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 adrenoceptores 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 e Ryall, 2008; Lynch, 2011). A AC é uma enzima transmembrânica responsável por converter adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que por sua vez ativa várias moléculas efetoras, dentre as quais podemos destacar a proteína kinase A (PKA), as quais estão envolvidas em uma série de processos, tais como na regulação do ciclo celular, na proliferação e diferenciação celular e na regulação dos mecanismos de transporte intracelular (Tasken e Aandahl, 2004) (Figura 2).

A via $G\alpha_s$ -AC-AMPc (Figura 2) é considerada a via de sinalização β_2 -adrenérgica clássica, por ser a mais bem caracterizada e é responsável pelo menos parcialmente pela hipertrofia muscular esquelética induzida pela ativação β_2 -adrenérgica através da estimulação de vias indutoras de síntese protéica (Hinkle et al., 2002; Navegantes et al., 2002). Além disso, como citado anteriormente, o dímero $G\beta\gamma$ também é capaz de ativar vias independentes de AMPc, como é o caso da via PI3K/AKT (phosphoinositol 3-kinase/AKT) (Figura 3), uma importante reguladora do trofismo muscular (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001). Foram descritas três diferentes isoformas de AKT (também conhecida como Proteína Kinase B - PKB), porém no músculo esquelético a isoforma predominante é o AKT1 (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 (Lopez-Illasaca et al., 1997) (Figura 3). Em seguida PDK fosforila AKT (Lopez-Illasaca et al., 1997) (Figura 3).

Figura 2 - Representação da via de sinalização β_2 -adrenérgica clássica: $G\alpha_s$ -AC-AMPC.

A ativação do adrenoceptor β_2 ocorre através da ligação do agonista no sítio de ligação do receptor, que resulta na associação da subunidade α da proteína G no sítio de fosforilação do receptor. Essa associação deve-se a substituição de GDP por GTP da proteína $G\alpha$ o que acarreta numa mudança conformacional da estrutura heterotrimérica desta proteína, desencadeando a cascata de sinalização representada. A referida associação ativa adenilil ciclase que converte ATP em AMPC, e este ativa a proteína kinase A (*protein kinase A*, PKA), proteína esta 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 associadas ao aumento de síntese protéica.

FONTE: Adaptado de Lynch e Ryall (2008).

Várias vias dependentes de AKT são ativadas no músculo esquelético após a estimulação β_2 -adrenérgica, culminando predominantemente na indução de hipertrofia muscular (Lynch, 2011; Lynch e Ryall, 2008). Um estudo demonstrou que a estimulação β_2 -adrenérgica resulta na fosforilação de AKT e subsequente ativação de mTOR (mammalian target of rapamycin) (Kline et al., 2007), uma kinase que possui papel essencial na determinação de hipertrofia muscular (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001) (Figura 3). É bem estabelecida a associação de mTOR a *raptor* (*regulatory associated protein of mTOR*) e G β L (*G protein β -subunit-like protein*) formando o complexo mTORC1 (mTOR-raptor-G β 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) (Figura 3). Uma vez ativada pelo mTORC1, a S6K induz tradução através da fosforilação do polipeptídeo ribossômico (Bolster et al., 2004; Hara et al., 1998). Outra forma pela qual o mTORC1 induz tradução é através da fosforilação inibitória do 4EBP1 (regulador negativo do fator de iniciação da tradução eif4E; *euchariotic initiation factor 4E*) (Hara et al., 1997) (Figura 3).

Figura 3 - Representação da via de sinalização não clássica β_2 -adrenérgica: PI3K/AKT.

O dímero G $\beta\gamma$ 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 kinase AKT e para PDK. PDK fosforila AKT que resulta na ativação de mTOR que se associa a raptor e G β L 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 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β) que acarreta na expressão do fator de iniciação eucariótico eIF2B favorecendo a síntese proteica. AKT fosforila o fator de transcrição forkhead box O transcription (FOXO), o que inibe a ação deste na ativação de genes envolvidos na degradação proteica como muRF1 e atrogina-1, também é inibido pela ativação de AKT.

FONTE: Adaptado de Lynch e Ryall et.al., 2008.

Outros fatores controladores do trofismo muscular e influenciados por AKT incluem glicogênio sintase quinase 3 β (*glycogen synthase kinase 3 β* ; GSK3 β) (Bodine et al., 2001) e fator de transcrição *forkhead box O* (*forkhead Box O transcription factors*; FOXO) (Furuyama et al., 2002). GSK3 β é um regulador negativo da tradução de proteína e expressão gênica, é fosforilado e subsequentemente inativado por AKT o que resulta numa expressão da forma negativa de GSK3 β . O fator GSK3 β normalmente atua inibindo a da tradução eIF2B (*eucariotic initiation factor 2B*) e quando AKT o inativa,

promove a síntese protéica (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001). AKT também favorece a síntese protéica através da inibição de FOXO (Figura 3), um fator de transcrição envolvido na ativação de genes indutores de degradação protéica, como é o caso de atrogina-1 e muRF-1 (*muscle ring finger-1*) que são enzimas (ubiquitina-ligasas) envolvidas na principal via proteolítica do músculo esquelético, a via ubiquitina-proteassoma (Gomes et al., 2001; Lecker et al., 2004) (Figura 4). Esta via é composta de uma cascata de reações enzimáticas em que inicialmente, E1 (enzima ativadora de ubiquitina) ativa a ubiquitina com gasto de ATP, E2 (enzima conjugadora de ubiquitinas) conjuga as ubiquitinas em um complexo de poliubiquitinas e em seguida, E3 (enzima ubiquitina-ligase) liga o complexo de poliubiquitinas à proteína-alvo, que é reconhecida e degradada em pequenos peptídios pelo proteassoma 26S (Jentsch, 1992) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema representativo da via ubiquitina-proteassoma.

1ª etapa: E1 (enzima ativadora de ubiquitina) ativa a ubiquitina com gasto de ATP; 2ª etapa: E2 (enzima conjugadora de ubiquitinas) conjuga as ubiquitinas em um complexo de poliubiquitinas; 3ª etapa: E3 (enzima ubiquitina-ligase) liga o complexo de poliubiquitinas à proteína-alvo; 4ª etapa: o complexo de poliubiquitinas associado à proteína alvo é reconhecido pelo proteassoma 26S; 5ª etapa: O proteassoma 26S degrada a proteína alvo em pequenos peptídeos.

FONTE: Adaptado de Lecker et al., 2004.

O uso de agonistas sintéticos capazes de estimular a via β_2 -adrenérgica tem sido estudado para testar os efeitos biológicos desses agonistas na musculatura esquelética. Já é bem estabelecido que os agonistas β_2 -adrenérgicos, de uma forma geral, induzem significativamente o aumento da massa muscular e, além disso, diminuem o conteúdo de gordura corporal, especialmente quando administrados sistemicamente e em altas doses (Beitzel et al., 2004; Ryall et al., 2006). Estes efeitos têm atraído a indústria alimentícia na tentativa de aumentar o conteúdo protéico da carne bovina (Sillence e Matthews, 1994) e também de atletas com o intuito de acelerar o ganho de massa muscular (Delbeke et al., 1995). O efeito da administração de agonistas β_2 -adrenérgicos no músculo esquelético tem sido investigado em diversas condições envolvendo a perda de massa muscular como consequência da idade (Ryall et al., 2007) da caquexia associada ao câncer e à AIDS (Fuster et al., 2007; Kenley et al., 2008), distrofias musculares (Gehrig et al., 2010) da sepse, do desuso, da desnervação, da falência renal crônica, da falência cardíaca, da 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 e Ryall, 2008), possivelmente através dos mecanismos dependentes e independentes de AMPc anteriormente explicitados. Além de seu efeito anabólico e lipolítico, os agonistas β_2 -adrenérgicos também induzem a conversão de fibras musculares do tipo I em fibras do tipo II (Ciciliot e Schiaffino, 2010).

O papel de agonistas β_2 -adrenérgicos na regeneração muscular esquelética também tem sido investigado, estudos têm mostrado que o tratamento com o agonista β_2 -adrenérgico clenbuterol em músculos jovens transplantados é capaz de antecipar a proliferação de células satélites quando comparado aos músculos apenas transplantados (Roberts e McGeachie, 1992). Além disso, agonistas β -adrenérgicos seletivos e não seletivos para a isoforma β_2 , também induzem o aumento do conteúdo protéico e do diâmetro das fibras musculares jovens em regeneração e consequente melhora funcional (Ryall et al., 2008b). Embora os agonistas β_2 -adrenérgicos proporcionem melhora estrutural e funcional do músculo esquelético jovem em regeneração, os mecanismos intracelulares envolvidos nesses efeitos são pouco conhecidos.

Apesar dos seus efeitos benéficos sobre a musculatura esquelética, os agonistas β_2 -adrenérgicos possuem efeitos deletérios, dentre os quais se destaca a hipertrofia cardíaca (Prather et al., 1995), os quais têm limitado o seu potencial terapêutico. Nesse

sentido, uma nova geração de agonistas β_2 -adrenérgicos sintéticos, como é o caso do salmeterol e do formoterol, tem sido utilizada por ser mais seletiva aos adrenoreceptores β_2 e mais potente quando comparada à velha geração de agonistas β_2 . Considerando-se que diferentemente do músculo esquelético (onde se predominam os adrenoreceptores β_2) o músculo cardíaco possui maior densidade de adrenoreceptores β_1 , agonistas mais seletivos à isoforma β_2 do adrenoreceptor proporcionam menores efeitos deletérios ao coração. De fato, doses menores (menores do que $\sim 25 \mu\text{g/Kg/dia}$) destes agonistas β_2 mais seletivos (formoterol e salmeterol) são capazes de induzir os mesmos efeitos benéficos musculares causados por altas doses (acima de $\sim 1000 \mu\text{g/Kg/dia}$) dos agonistas β_2 -adrenérgicos da velha geração, sem causar prejuízos significativos ao coração (Lynch e Ryall, 2008a ; Ryall et al., 2006). O formoterol (200-400 vezes mais seletivo à isoforma β_2 do que à isoforma β_1 do adrenoreceptor) possui maior seletividade ao adrenoreceptor β_2 do que o salbutamol (droga pertencente à velha geração de agonistas β_2 -adrenérgicos; KD do formoterol=8,12 versus KD do salbutamol= 6,44) e tem sido o agonista β_2 -adrenérgico da nova geração de efeito mais eficiente sobre o músculo esquelético (Ryall et al., 2006). Foi verificado que o tratamento com baixas doses de formoterol ($1 \mu\text{g/Kg/dia}$ a $25 \mu\text{g/kg/dia}$) são capazes de induzir hipertrofia muscular significativa (Ryall et al., 2006) e também minimizar a perda de massa muscular de ratos idosos (Ryall et al., 2007) sem causar hipertrofia cardíaca significativa. Além disso, baixas doses deste mesmo agonista também melhoram tanto a estrutura quanto a função de fibras musculares de ratos adultos em regeneração (Ryall et al., 2007).

Considerando-se que 1) apesar de se conhecer os efeitos benéficos dos agonistas β_2 -adrenérgicos sintéticos sobre a regeneração muscular em nível estrutural, os mecanismos intracelulares envolvidos nesse processo ainda estão pouco esclarecidos, e que 2) ainda não se conhece o possível papel de agonistas β_2 -adrenérgicos sobre a atenuação do déficit regenerativo muscular em indivíduos idosos; esse estudo visa explorar o papel do agonista β_2 -adrenérgico formoterol em aspectos histológicos, moleculares e funcionais da regeneração do músculo sóleo de ratos idosos.

1.5 Justificativa e relevância do estudo

Atualmente se reconhece a importância da integridade da musculatura esquelética para a manutenção da qualidade de vida. Com o avanço da idade ocorre perda gradual da massa muscular (Janssen, 2010; Lynch, 2011) e um marcante déficit do potencial regenerativo da musculatura esquelética em idosos, fatores estes relacionados com a síndrome da fragilidade senil (Topinkova, 2008), caracterizada pela maior susceptibilidade a quedas e posterior imobilização, menor capacidade de manter as funções vitais, surgimento de doenças e mortalidade precoce (Topinkova, 2008). Neste contexto, a melhor compreensão da sinalização β_2 -adrenérgica no músculo esquelético de ratos idosos em regeneração servirá de base para a identificação de novos alvos terapêuticos e para o desenvolvimento de novas estratégias no intuito de se atenuar os efeitos deletérios do envelhecimento sobre a musculatura esquelética, em especial o déficit da capacidade regenerativa que acompanha muitas doenças, e consequentemente contribuir para uma maior longevidade associada a uma melhor qualidade de vida. Este estudo se propõe a contribuir para o melhor entendimento dos efeitos da estimulação β_2 -adrenérgica no músculo esquelético em regeneração e investigar o possível efeito benéfico do tratamento com o agonista β_2 -adrenérgico formoterol em atenuar o déficit regenerativo muscular em ratos idosos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente projeto tem por objetivo contribuir para o melhor entendimento dos efeitos da estimulação β_2 -adrenérgica no músculo esquelético em regeneração e das alterações envolvidas no déficit regenerativo muscular em indivíduos idosos bem como testar o efeito do tratamento com o agonista β_2 -adrenérgico formoterol na minimização do déficit regenerativo muscular esquelético de ratos idosos. Dessa forma, nossos objetivos específicos englobam:

2.2 Objetivos específicos

- a) Estudar o efeito do agonista β_2 -adrenérgico formoterol em aspectos macroscópicos e histológicos da regeneração dos músculos sóleo de ratos idosos;
- b) Estudar o efeito do agonista β_2 -adrenérgico formoterol sobre os elementos de possíveis vias reguladoras do trofismo muscular, mais especificamente, a via clássica dependente de AMPc e a via indutora de síntese protéica PI3K-AKT-mTORC1 durante a regeneração do músculo sóleo de ratos idosos;
- c) Estudar o efeito do agonista β_2 -adrenérgico formoterol sobre a função contrátil do músculo sóleo de ratos idosos em regeneração.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo para uso de animais deste trabalho foi aprovado segundo os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) (nº 132/08, do livro 2).

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar jovens (2-4 meses, 250-300 g) e ratos Wistar idosos (18-20 meses, 400-600 g), mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas contendo maravalha, água e ração *ad libitum*, com regime claro/escuro de 12h/12h.

3.2 Grupos experimentais

Os efeitos do tratamento contínuo com formoterol no músculo esquelético foram avaliados em diferentes períodos de regeneração. Em todos os animais, o músculo sóleo da pata esquerda foram criolesados e os da pata direita foram utilizados como controle. Os ratos (jovens e idosos) foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=6 cada) como segue:

a) Grupo criolesado (10 dias): Os animais jovens (1º grupo) e animais idosos (2º grupo) tiveram o músculo sóleo da pata esquerda criolesado e analisado após 10 dias. O músculo da pata contralateral serviu de controle intacto;

b) Grupo criolesado (21 dias): Os animais jovens (3º grupo) e animais idosos (4º grupo) tiveram o músculo sóleo da pata esquerda criolesado e analisado após 21 dias. O músculo da pata contralateral foi usado como controle intacto;

c) Grupo criolesado + formoterol (10 dias): Os animais jovens (5º grupo) e os animais idosos (6º grupo) tiveram o músculo sóleo da pata esquerda criolesado e tratados diariamente com formoterol durante 10 dias. O músculo da pata contralateral foi usado como controle apenas tratado com formoterol;

d) Grupo criolesado + formoterol (21 dias): Os animais jovens (7º grupo) e os

animais idosos (8º grupo) tiveram o músculo sóleo da pata esquerda criolesado e tratados diariamente com formoterol durante 21 dias. O músculo da pata contralateral serviu como controle apenas tratado com formoterol.

3.3 Protocolo de criolesão

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (5 mg/100 g de peso corporal, intraperitoneal) e o músculo sóleo 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 (0,4 x 0,4 cm), previamente imersa em nitrogênio líquido, sobre toda a superfície do músculo sóleo 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.

3.4 Tratamento com formoterol

O formoterol (formoterol hemifumarate®; Tocris Bioscience, Ellisville, M.O., E.U.A.) foi administrado por meio de injeções subcutâneas bilaterais em ambos os membros posteriores, diariamente numa dose de 1 µg/kg de peso corporal em cada membro (dose total diária: 2 µg/kg de peso corporal) (Ryall et al., 2006). O tratamento iniciou-se imediatamente após a criolesão e terminou de acordo com cada grupo experimental, ou seja, após 10 ou 21 dias. O tratamento subcutâneo foi adotado em nossos experimentos, pois mostrou resultado morfológico mais significativo (a área de secção transversal da fibra muscular foi maior) do que o tratamento via intraperitoneal em experimento teste realizado previamente (dados não mostrados).

3.5 Histologia

Após o período de tratamento de acordo com cada grupo experimental, os ratos foram pesados, sacrificados por decapitação e os músculos sóleo foram removidos e pesados. Cada músculo foi dividido em duas partes iguais por meio de um corte transversal no ventre muscular. Uma metade de cada músculo foi destinada para 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 do conteúdo de AMPc tecidual ou para determinação da expressão de mTOR.

Cortes transversais seriados (10 μ m de espessura) foram obtidos da região média dos músculos destinados à histologia utilizando-se um criostato (IEC Minotome), mantido à temperatura de -25°C .

Secções histológicas não fixadas foram coradas com azul de toluidina para análise da morfologia geral (Morini et al., 1998) e para a determinação da área de secção transversal das fibras musculares que foi medida através do software *Image Pro-Plus*.

3.6 Mensuração da contração muscular

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.). O nervo ciático foi exposto e conectado a um eletro-estimulador e o tendão do músculo sóleo foi isolado para evitar interferência de outros músculos durante o estímulo. Os ratos foram colocados sobre uma plataforma de acrílico, o joelho e a pata foram fixados por meio de uma barra metálica. O tendão do músculo sóleo foi conectado a um transdutor de força (Grass Instruments, Cidade de Quincy, MA, EUA) acoplado a um polígrafo (Narco Biosystems, Houston, TX, EUA)

Para iniciar o experimento, foi determinado o comprimento ótimo do músculo (L_0) capaz de produzir a força tetânica máxima (Chan e Head, 2010). A curva força-frequência foi obtida pela análise da força máxima produzida nas frequências de 25, 50, 100 e 150 Hz, com dois minutos de repouso entre cada uma, verificou-se que a frequência de 50 Hz foi suficiente para obter contração tetânica máxima.

Contrações isoladas (0,2 Hz) foram geradas continuamente por 10 min, seguida por contração tetânica (50 Hz) por 50 s em cada músculo sóleo analisado. Não foram observadas diferenças entre as contrações isoladas dos grupos analisados, sendo assim, apresentamos apenas os resultados referentes a força tetânica máxima (P_0 , mN) e força específica [razão entre P_0 e a área de secção transversal do músculo (AST); mN/mm^2].

3.7 Ensaio de incorporação de aminoácidos

Em 10 dias após criolesão, os ratos foram anestesiados e o músculo sóleo foi removido e fixado num clipe de metal para manter o seu comprimento normal. O músculo sóleo foi cortado longitudinalmente e pré- incubado a 34 °C por 3 horas em frascos fechados de Erlenmeyer contendo 5 mL da solução *Krebs Ringer* oxigenado, com ou sem adição de 10^{-5} M de formoterol (Stirewalt e Low, 1983). A concentração de 10^{-5} M de formoterol foi previamente determinada por uma curva de titulação, e foi escolhida para incubar as amostras criolesadas, desde que fosse capaz de significativamente aumentar a síntese de proteínas sem causar danos musculares, como confirmado pela determinação da atividade do lactato desidrogenase (dados não demonstrados). As amostras dos músculos foram incubadas por 2 horas em meio Dulbecco modificado por eagle (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) suplementado com 0,5 mM de fenilalanina marcada com carbono-14 [$U-^{14}C$] (0,2 $\mu Ci/mL$), combinado ou não com 10^{-5} M de formoterol. No final do período de incubação, os músculos foram congelados em nitrogênio líquido e logo em seguida pesados. Os músculos congelados foram homogeneizados em 1 mL de TCA 10 % e centrifugados por 10 minutos a 8.000 G. Os pellets foram lavado com 1 mL de TCA 10 % e com 1 mL etanol : éter (1:1). Os *pellets* secos foram solubilizados em 500 μL de KOH 1 M. O coquetel de cintilação (1,5 mL de Ecolume; ICN Biomedicals, Irvine, C.A., E.U.A.) foi adicionado a 200 μL de *pellet* solubilizado. As amostras foram analisadas pela radioatividade no canal [$U-^{14}C$] (contador de líquido de cintilação). A síntese de proteína foi expressa como contagem por minuto (c.p.m.) de [$U-^{14}C$] fenilalanina incorporada por miligrama (mg) de proteína muscular em um período de incubação de 2 horas.

3.8 Mensuração do conteúdo de AMP_c tecidual

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 AMPc foi determinada através do método ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) utilizando-se um kit comercial (Cayman Chemicals, EUA) (Silvina Lo Presti et al., 2008).

3.9 Anticorpos para Western blot

Os anticorpos primários utilizados para western blot foram: *anti-rabbit* policlonal para mTOR fosforilado (Ser2448; 1:1000; cat# 2971; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) e *anti-rabbit* policlonal para mTOR (1:1000; cat# 2972; Cell Signaling Technology). O anticorpo secundário usado para todos os experimentos de western blot foi a peroxidase conjugada *AffiniPure goat anti-rabbit IgG* (1:10000; cat# 111-035-003; Jackson ImmunoResearch Laboratories).

3.10 Western blotting

A técnica de Western blotting foi realizada para determinar a expressão de mTOR fosforilado e total nos músculos sóleo dos grupos experimentais avaliados em 10 dias após criolesão, período caracterizado por intensa síntese protéica muscular (Miyabara et al., 2010).

Os músculos foram removidos imediatamente após o sacrifício do animal. As amostras de músculos foram homogeneizadas tampão contendo 90 mM de KCl, 10 mM de HEPES (*4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid*), 3 mM de $MgCl^{2+}$, 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), proteinase e coquetel de 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 protéico do sobrenadante foi determinado pelo método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, C.A., E.U.A.) com albumina de soro bovino como referência. Quantidades iguais de proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8 %) através da

eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Trans-Blot Semi-Dry, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). 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 contra mTOR fosforilado ou total 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 4 horas 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 densidade das bandas foi quantificada por um software de análise de imagem Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, E.U.A).

3.11 Análises morfométricas

As análises morfométricas foram realizadas utilizando-se o software *Image Pro-Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). A área de secção transversal das fibras musculares foi obtida de aproximadamente um total de 2000 fibras de cada músculo (aproximadamente de 3 a 4 secções transversais de cinco músculos de cada grupo). Nos grupos criolesados, a área de secção transversal foi obtida somente das fibras musculares previamente lesadas (fibras musculares com núcleo centralizado).

3.12 Análises estatísticas

Comparações múltiplas da média dos valores foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) e o teste post-hoc de Bonferroni quando apropriados. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para comparar as frequências de distribuição da área de secção transversal das fibras musculares entre os grupos. Para todas as comparações, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento com formoterol no peso corporal, peso cardíaco e peso muscular de ratos idosos

O peso corporal dos animais jovens e idosos que não foram tratados com formoterol não foi alterado durante o período de 10 e 21 dias. Além disso, o peso corporal dos ratos jovens não sofreu alteração após 10 dias de tratamento com formoterol, enquanto que após 21 dias de tratamento, houve aumento significativo quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado por 10 dias (16 % vs. C; 14,8 % vs. F 10 d; $p<0,05$) (Tabela 1). Os animais idosos tratados com formoterol durante 10 e 21 dias também apresentaram aumento do peso corporal quando comparados ao grupo controle (F10d: 15 %; F21d: 18,5 %; $p<0,05$) (Tabela 1).

O peso muscular dos ratos jovens não foi alterado pelo tratamento com formoterol em 10 e 21 dias após a lesão (Tabela 1). Nos ratos idosos, os músculos tratados com formoterol durante 10 e 21 dias apresentaram uma tendência de aumento que não foi diferente do grupo controle (Tabela 1). O peso do músculo idoso lesado e tratado com formoterol durante 10 dias aumentou quando comparado ao grupo apenas lesado (68 % vs. Crio 10d; $p<0,05$) (Tabela 1), porém esse aumento não foi observado após 21 dias de tratamento.

Na análise do peso do coração verificou-se que não houve alteração dessa medida nos animais tratados com formoterol durante 10 dias (Tabela 1). Entretanto, observa-se uma tendência de aumento em 21 dias nos ratos jovens e idosos sendo que esses dados apenas foram significativos nos ratos idosos (36% vs. C; $p<0,05$).

Tabela 1 - Comparação entre peso corporal, peso muscular e peso do coração dos ratos jovens e idosos

PC (g)	Jovens	C	C10d	C21d	F10d	F21d		
		286±30	306±20	318±27	289±14	332±12* ^a		
	Idosos	C	C10d	C21d	F10d	F21d		
460±34 [#]		469±33 [#]	478±23 [#]	530±34* ^{c#}	545±20* ^{d#}			
PM (g)	Jovens	C	F10d	Crio10d	Crio+F10d	F21d	Crio21d	Crio+F21d
		0,11±0,01	0,12±0,01	0,12±0,02	0,12±0,03	0,13±0,004	0,13±0,01	0,10±0,02
	Idosos	C	F10d	Crio10d	Crio+F10d	F21d	Crio21d	Crio+F21d
		0,18±0,04	0,27±0,05 [#]	0,19±0,05 [#]	0,32±0,0* ^{b#}	0,27±0,1 [#]	0,19±0,02 [#]	0,22±0,1 [#]
PCç (g)	Jovens	C	F10d			F21d		
		0,83±0,02	0,81±0,03			1,09±0,07		
	Idosos	C	F10d			F21d		
		1,24±0,13 [#]	1,43 [#] ±0,04 [#]			1,69±0,12* [#]		

Valores são expressos como média ± desvio padrão; $n = 3-6$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações entre os grupos.

PC: peso corporal; PCç: peso do coração; PM: peso do músculo; C: controle; F10d e F21d: Animais tratados com formoterol e analisados depois de 10 e 21 dias, respectivamente; Crio 10d, e Crio 21d: grupos apenas criolesado e analisado após 10 e 21 dias, respectivamente; Crio+F10d e Crio+F21d: grupos criolesados e tratados com formoterol e analisados após 10 e 21 dias, respectivamente. ^{*} $p < 0,05$ vs. C; ^a $p < 0,05$ vs. F 10 d; ^b $p < 0,05$ vs. Crio 10 d; ^c $p < 0,05$ vs. C 10d; ; ^d $p < 0,05$ vs. C 21d; [#] $p < 0,05$ vs. o grupo correspondente ao de ratos jovens.

FONTE: Silva (2011)

4.2 Efeito do formoterol em aspectos histológicos do músculo sóleo em regeneração de ratos idosos

Os músculos intactos dos ratos jovens e idosos apresentaram uma estrutura tecidual normal, ou seja, com fibras de formato poligonal e com núcleo periférico (Figura 5a). Entretanto, os músculos idosos apresentaram mais fibras com maior área de secção transversal quando comparadas com as fibras dos músculos jovens (97% vs. 67% maiores do que $1.800 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 6a).

Os músculos jovens e idosos tratados com formoterol não apresentaram sinais de lesão (Figura 5a). Músculos jovens intactos tratados com formoterol durante 10 dias tiveram fibras musculares com maior área de secção transversal quando comparadas com os músculos controle (79 % vs. 67 % maiores que $1.800 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 6a). No entanto, os músculos idosos apenas tratados com formoterol

por 10 dias não apresentaram alteração da área de secção transversal de suas fibras musculares quando comparada com aquelas do grupo controle intacto (Figura 6a).

Após 21 dias de tratamento com formoterol, os músculos jovens apresentaram fibras musculares com área de secção transversal maior do que o controle intacto. Por outro lado, os músculos idosos tratados durante 21 dias com formoterol tiveram mais fibras musculares com área de secção transversal menor quando comparada com àquela das fibras do grupo controle intacto (músculos jovens: 79% vs. 67% maiores que $1.800 \mu\text{m}^2$, respectivamente; músculos idosos: 12% vs. 3% menores que $1.800 \mu\text{m}^2$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 6b).

Em 10 dias após lesão, músculos jovens e idosos apresentaram células musculares em diferentes estágios de regeneração com infiltrado inflamatório e células com núcleo centralizado de diversos tamanhos (Figura 5a). Nos ratos jovens, 99% das fibras musculares lesadas e avaliadas após 10 dias apresentaram área de secção transversal menor do que $1.800 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$; Figura 6a). Nos ratos velhos lesados e avaliados após 10 dias, 72% das fibras musculares tiveram a área de secção transversal menor do que $1.800 \mu\text{m}^2$ e 28% tiveram a área de secção transversal entre 1.800 e $6.600 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,05$; Figura 6a). Por outro lado, jovens e idosos criolesados e tratados com formoterol analisados nesse mesmo período, apresentaram menor processo inflamatório (Figura 5a) e menos fibras musculares com menor área de secção transversal quando comparada com àquela das fibras dos seus respectivos grupos apenas criolesados (57% e 27% menores que $1.800 \mu\text{m}^2$, respectivamente, $p < 0,05$; Figura 6a).

Vinte e um dias após a criolesão, os músculos dos ratos jovens apresentaram sinais clássicos da regeneração (Karpati et al., 1988) como indicados pela presença de células com núcleo centralizado e fragmentações celulares (Figura 5b). Além disso, os músculos jovens lesados e tratados com formoterol por 21 dias apresentaram mais fibras musculares em regeneração com área de secção transversal maior quando comparada com àquela das fibras dos músculos apenas criolesados (57% vs. 33% foram maiores que $1.200 \mu\text{m}^2$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 6b).

Os músculos idosos criolesados analisados após 21 dias continuaram mostrando inflamação pronunciada e menos organização das fibras musculares em fascículos (Figura 5b), contudo apresentaram mais fibras musculares com área de secção transversal maior quando comparada àquela das fibras dos músculos apenas criolesados (86% vs. 74% maiores que $1.200 \mu\text{m}^2$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 6b). Além disso, os músculos idosos em regeneração tratados com formoterol por 21 dias

apresentaram sinais histológicos similares àqueles observados nos músculos jovens, como indicada pela redução da inflamação e uma organização melhor das fibras musculares nos fascículos (Figura 5b).

Figura 5a - Secções transversais de músculo sóleo de ratos jovens corados com azul de toluidina.

a: Músculo controle intacto; b: Músculo tratado com formoterol durante 21 dias. c: Músculo apenas criolesado e analisado 10 dias após criolesão. d: Músculo lesado e tratado com formoterol analisado 10 dias após a lesão. e: Músculo apenas criolesado e analisado 21 dias após a criolesão. f: Músculo criolesado e tratado com formoterol e analisado 21 dias após a lesão. Asteriscos (*) indicam processo inflamatório e pontas de seta indicam fibras musculares com núcleo centralizado. Barra: 50 μ m.

FONTE: Silva (2011).

Figura 5b - Secções transversais de músculo sóleo de ratos idosos corados com azul de toluidina.

LEGENDA: a: Controle intacto; b: Músculo tratado com formoterol durante 21 dias. c: Músculo apenas criolesado analisado 10 dias após criolesão. d: Músculo lesado e tratado com formoterol analisado 10 dias após a lesão. e: Músculo apenas criolesado e analisado 21 dias após a criolesão. f: Músculo idoso criolesado e tratado com formoterol e analisado 21 dias após a lesão. Asteriscos (*) indicam processo inflamatório e pontas de seta indicam fibras musculares com núcleo centralizado. Barra: 50 μ m.

FONTE: Silva (2011).

Figura 6a - Frequências de distribuição das áreas de secção transversal das fibras musculares dos músculos sóleo de ratos jovens e idosos analisados em 10 dias após criolesão.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar diferenças entre os grupos. ($n = 3-6$).

AST: área de secção transversal;

C: Músculo controle;

F 10d: músculo tratado com formoterol durante 10 dias;

Crio 10d: músculo apenas criolesado e analisado 10 dias após lesão;

C+F 10d: músculo lesado e tratado com formoterol e analisado em 10 dias após lesão.

FONTE: Silva (2011)

Figura 6b - Frequências de distribuição das áreas de secção transversal das fibras musculares dos músculos sóleo de ratos jovens e idosos analisados em 21 dias após criolesão.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para testar diferenças entre os grupos. ($n = 3-6$).

AST: área de secção transversal;

C: Músculo controle;

F 21 d: músculo tratado com formoterol e analisado em 21 dias;

Crio 21 d: músculo apenas criolesado e analisado 21 dias após lesão;

Crio + F 21d: músculo lesado e tratado com formoterol e analisado 21 dias após lesão.

FONTE: Silva (2011).

4.3 Efeito do formoterol sobre a função contrátil do músculo sóleo em regeneração de ratos idosos

O efeito do formoterol na recuperação funcional do músculo sóleo após criolesão foi avaliado por meio da análise da força tetânica máxima e força específica em 10 dias após lesão. Os animais jovens não apresentaram diferença na força tetânica

quando comparados aos animais idosos. No entanto, em todos os grupos dos animais idosos a força específica foi menor comparada a dos animais jovens (Figura 7). A força tetânica máxima e a força específica foram maiores nos animais jovens que receberam o tratamento com formoterol por 10 dias quando comparadas com as dos seus respectivos grupos controles (25% e 11%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 7), porém não houve alteração nos animais idosos. Os animais jovens e idosos que foram criolesados e observados após 10 dias de criolesão mostraram uma diminuição na força tetânica máxima e força específica quando comparados aos seus respectivos grupos controle (jovem: 48% e 51%, respectivamente; idoso: 40% e 63%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 7). Os animais jovens e idosos que foram criolesados e tratados com formoterol apresentaram aumento na força tetânica máxima e na força específica quando comparados aos animais apenas criolesados (jovens: 39% e 42%, respectivamente; idosos: 15% e 90%, respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 7).

Figura 7a - Comparação da força tetânica máxima (mN) dos animais jovens e idosos.

Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n = 3-5$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações para testar as diferenças entre os grupos.

C: Músculo controle;

F 10d: músculo tratado com formoterol durante 10 dias;

Crio 10d: músculo apenas criolesado analisado 10 dias após lesão;

Crio+F 10d: músculo lesado e tratado com formoterol analisado em 10 dias após lesão.

FONTE: Silva (2011).

Figura 7b - Comparação da força específica (mN / mm²) dos animais jovens e idosos.

Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n = 3-5$. ANOVA seguido por teste de Bonferroni para múltiplas comparações para testar as diferenças entre os grupos.

C: Músculo controle;

F 10d: músculo tratado com formoterol durante 10 dias;

Crio 10d: músculo idosos. C apenas criolesado analisado 10 dias após lesão;

Crio+F 10d: músculo lesado e tratado com formoterol analisado em 10 dias após lesão.

* $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. Crio 10 d. # $p < 0,05$ vs. grupo jovem.

FONTE: Silva (2011).

4.4 Efeito do formoterol em aspectos moleculares do músculo sóleo em regeneração de ratos idosos

Os músculos jovens que foram tratados com formoterol por 10 dias apresentaram um aumento de síntese de proteínas quando comparados aos músculos do grupo controle intacto (34,5%; $p < 0,05$) (Figura 8), tal aumento não foi observado nos animais idosos. Os músculos jovens e idosos que foram criolesados e avaliados após 10 dias também apresentaram aumento da síntese de proteínas quando comparados aos músculos controle, no entanto esse aumento foi menor nos animais idosos (305% e 119%; respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 8). Além disso, os músculos jovens e idosos lesados e tratados com formoterol durante 10 dias apresentaram um aumento acentuado da síntese de proteínas quando comparados aos músculos apenas criolesados (77 % e 66 %; $p < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8 - Efeito *in vitro* do formoterol na síntese de proteínas do músculo esquelético de ratos jovens e idosos.

Dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 4-6$). ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações.

C: controle;

F 10d: grupo tratado com formoterol por 10 dias;

Crio 10d: grupo apenas criolesado e analisado após 10 dias;

Crio + F 10d: grupo criolesado e tratado com formoterol e analisado 10 dias após lesão;

c.p.m. Fen[¹⁴C]: contagem por minuto de fenilalanina marcada radioativamente com carbono-14.

* $p < 0,05$ vs. controle; ^a $p < 0,05$ vs. Crio 10 d.

FONTE: Silva (2011).

Os músculos dos ratos jovens e idosos tratados com formoterol por 10 dias apresentaram um aumento no conteúdo de AMPc tecidual quando comparados com seus respectivos controles intactos (108% e 109,5%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 9). Em contrapartida, os músculos jovens e idosos não tiveram alteração do conteúdo de AMPc em 10 dias após lesão quando comparados com os seus respectivos controles intactos (Figura 9). Os músculos jovens criolesados e tratados com formoterol por 10 dias demonstraram aumento do conteúdo de AMPc quando comparados com os músculos apenas criolesados (67%; $p < 0,05$) (Figura 9). Entretanto, os músculos de ratos idosos que foram criolesados e tratados com formoterol pelo mesmo período não exibiram aumento do conteúdo de AMPc tecidual quando comparados com o grupo apenas criolesado (Figura 9).

Figura 9 - Conteúdo de AMPc nos músculos sóleos tratados com formoterol e analisados 10 dias após a criolesão de ratos jovens e idosos.

Dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 5-6$). ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

C: Músculos controle;

F 10 d: músculos tratados com formoterol por 10 dias;

Crio 10 d: músculos apenas criolesados e analisados após 10 dias;

Crio + F 10d: músculos lesados e tratados com formoterol e analisados em 10 dias após lesão.

* $p < 0,05$ vs. respectivo controle; [#] $p < 0,05$ vs. Crio + F 10 d de ratos jovens; ^a $p < 0,05$ vs. F 10 d de ratos idosos

FONTE: Silva (2011)

Os músculos jovens e idosos que foram apenas tratados com formoterol por 10 dias exibiram um aumento significativo na fosforilação da proteína mTOR quando comparados com os seus respectivos controles (365% e 85%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 10). A fosforilação de mTOR também aumentou em músculos jovens e idosos que foram apenas criolesados e avaliados após 10 dias quando comparados com os seus respectivos controles intactos (290% e 270%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 10). Além disso, os músculos jovens e idosos que foram criolesados e tratados com formoterol por 10 dias apresentaram uma fosforilação de mTOR maior em músculos jovens e idosos quando comparados com os seus respectivos grupos criolesados (28% e 31%, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 10).

Figura 10 - Expressão de mTOR fosforilado e total em músculos

Valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão; $n=4$. ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

C: Músculos controle;

F 10 d: músculos tratados com formoterol por 10 dias;

Crio 10 d: músculos apenas criolesados e analisados após 10 dias;

Crio + F 10d: músculos lesados e tratados com formoterol e analisados em 10 dias após lesão.

p mTOR: mTOR fosforilado.

Ratos jovens (A; B) e idosos (C, D).

As membranas foram incubadas com anticorpo específico para mTOR fosforilado no resíduo serina (Ser²⁴⁸; p mTOR) e mTOR total. A razão entre o mTOR fosforilado e o mTOR total.

* Significativamente diferente do controle ($p < 0,05$); ^a $p < 0,05$ vs. F 10d da mesma idade; ^b $p < 0,05$ vs. Crio 10d da mesma idade

FONTE: Silva (2011).

5 Discussão

O déficit da capacidade regenerativa do músculo esquelético associado a uma capacidade reduzida de restaurar a massa e a função muscular são algumas das principais alterações da musculatura esquelética em indivíduos idosos (Degens, 2007; Sayer et al., 2006; Topinkova, 2008). Tais alterações acarretam sérias consequências como o aumento da morbidade e a diminuição da qualidade de vida (Degens, 2007; Sayer et al., 2006; Topinkova, 2008). O presente estudo mostra que o tratamento de ratos idosos com formoterol melhora significativamente a recuperação do tamanho das fibras musculares em regeneração do músculo sóleo. Este resultado pode ser corroborado com trabalhos prévios que relataram que agonistas β_2 -adrenérgicos podem melhorar a resposta regenerativa de músculos jovens (Beitzel et al., 2004; Bricout et al., 2004; Roberts e McGeachie, 1992) e prevenir a perda de massa muscular e consequente fraqueza de músculos idosos (Beitzel et al., 2004; Carter e Lynch, 1994; Chen e Alway, 2001). Estudos têm mostrado que o agonista β_2 -adrenérgico clenbuterol melhora de forma significativa a recuperação da massa de músculos que sofreram transplante (Roberts e McGeachie, 1992) ou lesão induzida pela toxina notexina (Bricout et al., 2004). Outros estudos também relatam que o agonista β_2 -adrenérgico fenoterol aumenta o calibre da fibra muscular, o conteúdo protéico e a produção de força em músculos jovens previamente lesados com a toxina bupivacaína (Beitzel et al., 2004). Além disso, a velha geração de agonistas β_2 -adrenérgicos como o clenbuterol, salbutamol e fenoterol aumentam significativamente a massa e a força de músculos idosos (Beitzel et al., 2004; Carter e Lynch, 1994; Chen e Alway, 2001). Uma das principais desvantagens em se utilizar o tratamento com a velha geração de agonistas β_2 -adrenérgicos sintéticos, sendo o clenbuterol o mais comumente utilizado, é a indução da hipertrofia cardíaca com consequente prejuízo na função cardíaca (Burniston et al., 2002; Duncan et al., 2000; Martinez-Navarro, 1990; Kilts et al., 2002). Este fato se deve à associação dos agonistas β_2 -adrenérgicos à isoforma β_1 do receptor adrenérgico que é predominante no coração (Lynch e Ryall, 2008). Dessa forma, esse estudo fez uso do tratamento com formoterol, pois este é um agonista da nova geração e, portanto, é mais seletivo à isoforma β_2 do receptor adrenérgico. Portanto, foi utilizada a dose diária de 2 $\mu\text{g/Kg}$ de formoterol ao longo de 10 e 21 dias e os dados demonstraram que houve alteração mínima no peso do coração após o tratamento, o que sugere que essa dose não causa

efeitos deletérios graves ao coração (Ryall et al., 2006). Além disso, podemos ressaltar que durante o envelhecimento ocorre um aumento do conteúdo da proteína $G\alpha_{\text{inibitória}}$ ($G\alpha_i$) no coração, o que induz uma redução da atividade de AC (Kilts et al., 2002), contribuindo para a diminuição dos efeitos dos agonistas β_2 -adrenérgicos sobre o tecido cardíaco. O efeito mínimo do formoterol em aumentar o peso do coração associado ao fato de que este agente farmacológico aumentou o ganho de peso corporal de ratos idosos contribui para a idéia de que o formoterol poderia atuar como um agente terapêutico na maximização da recuperação da massa da fibra muscular após a lesão em indivíduos idosos.

Recentemente, um estudo demonstrou que uma única injeção intramuscular de formoterol é capaz de promover melhora estrutural e da função contrátil de músculos esqueléticos jovens em regeneração (Ryall et al., 2008b). No entanto, essa forma de administração do formoterol seria menos apropriada para humanos uma vez que esta causaria lesão muscular e desconforto, o que poderia limitar as administrações repetidas desse agonista. Dessa forma, optamos pela administração de injeções subcutâneas de formoterol na região superficial do músculo lesado, o que diminuiria o desconforto da aplicação e ao mesmo tempo induziria uma maior concentração do agonista no local da lesão muscular.

Em relação aos dados de peso corporal, nosso estudo sugere que os ratos da linhagem Wistar continuam ganhando peso ao longo da idade (Passadore et al., 2004). Além disso, o tratamento com formoterol foi capaz de induzir um maior aumento no peso corporal em animais jovens e idosos, tal fato também foi observado por outro estudo que usou esse mesmo agonista numa dose de 25ug/Kg por 28 dias e verificou que o tratamento preveniu a perda de peso observada em ratos da linhagem Fischer 344 com 27 meses de idade (Ryall et al., 2007).

O peso corporal dos ratos jovens apresentou aumento significativo após o tratamento durante 21 dias com o agonista β_2 adrenérgico, no entanto tal dado parece não ter associação com o aumento do peso muscular, visto que os dados de peso muscular apresentaram variações não significativas nesses animais. Considerando-se que o efeito lipolítico dos agonistas β_2 -adrenérgicos é bem conhecido (Kim et al., 2010; Louis et al., 2000; Lynch e Ryall, 2008), futuros estudos poderiam investigar a composição corporal dos animais após o tratamento com formoterol a fim de avaliar os possíveis fatores que podem ter induzido o aumento do peso corporal.

Os resultados de peso muscular sugerem que o formoterol é capaz de promover o ganho de massa muscular nos animais idosos, fato que também foi observado em outro estudo que usou uma dose maior de formoterol (25ug/kg) por 28 dias em ratos da linhagem Fischer 344 com 27 meses de idade (Ryall et al., 2007). Além disso, é possível sugerir que o formoterol induziu uma melhor recuperação da massa dos músculos previamente criolesados. De fato, o trabalho de Ryall et al. (2008a) também mostrou que o tratamento com formoterol é capaz de aumentar o peso de músculos previamente lesados com bupivacaína avaliados após 7 dias. Considerando-se que o peso muscular é uma medida pouco refinada, decidimos avaliar a área de secção transversal das fibras musculares visto que esta análise é mais específica e, portanto, possibilita uma melhor análise do efeito do formoterol sobre a massa muscular.

Apesar de o músculo esquelético do rato idoso possuir uma maior densidade de adrenoceptores β_2 do que o músculo esquelético do rato jovem (Larkin et al., 1996), a resposta anabólica das fibras musculares do sóleo intacto após o tratamento com formoterol por 10 e 21 dias ocorreu apenas nos ratos jovens. Após 10 dias de administração do formoterol, as fibras do músculo intacto idoso não responderam ao tratamento, pois apresentaram um perfil de distribuição das áreas de secção transversal similar ao observado nas fibras musculares do músculo controle. Tal fato pode estar relacionado com a dessensibilização do adrenoceptor β decorrente de alterações no balanço entre síntese e degradação de adrenoceptores, nas populações de proteína G e na eficiência de acoplamento e atividade de AC; acarretando consequentemente no comprometimento da resposta biológica da célula muscular mediante o tratamento com o agonista (Beitzel et al., 2007).

Além disso, um período longo de tratamento com formoterol (21 dias) reduziu a área de secção transversal das fibras musculares de idosos, dado este que poderia estar associado ao fato da população de adrenoceptores β_2 no músculo sóleo ser passível de se ligar tanto a proteína $G\alpha_s$ quanto em $G\alpha_i$ (Gosmanov et al., 2002). Quando há o acoplamento com $G\alpha_i$, a atividade de AC é inibida, dessa forma o conteúdo de AMPc se apresenta reduzido, além de ocorrer o bloqueio da ação da subunidade C da PKA, o que poderia acarretar no aumento de proteólise muscular, pois essa subunidade é responsável por fosforilar a calpastatina que inibe a ação proteolítica das enzimas calpaínas (Ryall e Lynch, 2008a). Outro fato relevante está relacionado com a densidade dos receptores β , pois, como anteriormente mencionado, tem sido descrito que a densidade dos adrenoceptores β está aumentada em músculos idosos, entretanto o

adrenoceptor β_2 pode ficar susceptível a *downregulation*, ou seja, a densidade dos adrenoceptores se apresenta reduzida após estimulação crônica com o agonista por um possível defeito no mecanismo de reciclagem dos adrenoceptores o que poderia prejudicar o retorno destes ao sarcolema (Ryall e Lynch, 2008a). Futuros estudos seriam necessários para investigar sistematicamente o efeito da administração crônica do formoterol com períodos de descanso, i.e., suspensão temporária do tratamento com formoterol, para evitar a desensibilização e a *downregulation* do adrenoceptor β_2 .

Diferentemente às fibras musculares intactas de ratos idosos tratados com formoterol durante 10 dias, as fibras musculares lesadas de ratos idosos apresentaram aumento da área de secção transversal em 10 e 21 dias de tratamento com formoterol, o que sugere que o formoterol melhorou a recuperação da massa do músculo em regeneração de animais idosos. Além disso, esse estudo também sugere que o formoterol diminuiu o processo inflamatório e promoveu uma melhor organização das fibras musculares em regeneração nos fascículos, acarretando na melhora da reparação estrutural. Estes resultados podem ser corroborados por trabalhos que demonstraram que a estimulação dos adrenoceptores β_2 contribuem para o aumento da proliferação das células satélites e diferenciação (Roberts e McGeachie, 1992; Spurlock et al., 2006), estimula a síntese de proteínas (Navegantes et al., 2005), reduz o processo inflamatório, melhora a reparação vascular (Roberts e McGeachie et al., 1994) e o remodelamento de componentes da matriz extracelular (Pullar et al., 2008; Zhang et al., 2010).

Os nossos resultados referentes à contração muscular são corroborados por estudos recentes (Clarck e Fielding, 2011; Manini e Clarck, 2011) que apontam que a perda de força muscular ao longo da idade está fracamente associada à perda de massa muscular, pois o ganho de massa em ratos idosos intactos não preveniu a fraqueza muscular como demonstrado pela manutenção da força absoluta e redução da força por área do músculo (força específica). Como previamente mencionado, os benefícios na recuperação estrutural obtidos com o tratamento com formoterol nos músculos em regeneração também refletiram em uma melhor performance funcional. É interessante notar que apesar dos agonistas β_2 -adrenérgicos terem sido associados com uma maior fadigabilidade do músculo, um estudo recente demonstrou que o formoterol não altera a fadigabilidade nos ratos idosos (Ryall et al., 2007). Além disso, o formoterol é capaz de aumentar a proporção de fibras musculares do tipo II em músculo sóleo idoso o que poderia beneficiar a prevenção da sarcopenia, pois a lentidão dos movimentos devido à conversão de fibras do tipo II em fibras do tipo I que ocorre durante o envelhecimento

aumenta o índice de quedas e de lesões relacionadas às quedas. Além disso, o efeito lipolítico da estimulação β_2 -adrenérgica também poderia diminuir o surgimento de tecidos não-contráteis, comuns no músculo esquelético de idosos, o que poderia contribuir para uma melhor recuperação funcional dos músculos lesados de idosos (Mills, 2000).

O possível efeito benéfico do formoterol em melhorar a recuperação do calibre da fibra muscular em regeneração de ratos velhos nos estimulou a investigar o papel da ativação da via β_2 -adrenérgica na síntese protéica muscular. Verificamos que a dose de 10^{-5} M de formoterol induziu aumento da síntese protéica sem causar efeitos tóxicos ao músculo sóleo o que está de acordo com resultados de estudos prévios (Navegantes et al., 2002; Ryall et al., 2008). Como esperado, os músculos apenas criolesados e avaliados após 10 dias apresentaram um aumento da síntese protéica (Miyabara et al., 2010) na tentativa de recuperar a estrutura previamente lesada. Além disso, avaliamos os músculos jovens e idosos criolesados e tratados com formoterol por 10 dias e estes apresentaram um aumento acentuado da síntese de proteínas quando comparados aos seus respectivos grupos apenas criolesados. Este dado sugere que a melhora da recuperação muscular observada nos animais jovens e idosos é mediada pela ativação de possíveis vias envolvidas com a indução de síntese protéica.

A via $G\alpha$ -AC-cAMP tem sido descrita como a via clássica de ativação β_2 adrenérgica responsável por induzir, pelo menos parcialmente, a hipertrofia muscular (Hinkle et al., 2002; Navegante et al., 2000). Além disso, há evidências de que a via PI3K/AKT/mTOR, induzida pela ativação do dímero $G\beta\gamma$, também possa ter um papel importante na resposta hipertrófica do músculo esquelético após o estímulo com um agonista β_2 -adrenérgico (Kline et al., 2007; Lynch et al., 2002). Dessa forma, avaliamos o conteúdo de AMPc tecidual e a expressão da proteína mTOR na tentativa de verificar como um elemento da via clássica e da não clássica de ativação do adrenoceptor β_2 se comportam após o tratamento com formoterol em músculos jovens e idosos em regeneração. As amostras de ratos jovens e idosos apresentaram um aumento do conteúdo de AMPc tecidual após o tratamento com formoterol, confirmando que o tratamento com o agonista foi efetivo. Entretanto, ao contrário dos ratos jovens, a melhora da regeneração dos ratos idosos após o tratamento com formoterol não parece estar relacionada com a via clássica de ativação do adrenoceptor β_2 ($G\alpha$ -AC-cAMP) (Hinkle et al., 2002; Navegantes et al., 2000), como demonstrado pelos dados inalterados do conteúdo de AMPc.

O fato de que o AMPc parece não estar envolvido com os benefícios do formoterol na musculatura idosa em regeneração, nos induziu a verificar a expressão da proteína mTOR fosforilada, um dos principais elementos da via não clássica de ativação do adrenoceptor β_2 . Os músculos jovens e idosos tratados com formoterol apresentaram aumento na expressão de mTOR fosforilada, tal dado se mostra similar ao obtido por outro estudo que fez uso do agonista β_2 -adrenérgico clenbuterol em animais jovens (Kline et al., 2007). Adicionalmente, como esperado (Ge et al., 2009; Miyabara et al., 2010), os músculos de ratos jovens e idosos criolesados avaliados após 10 dias apresentaram aumento na ativação de mTOR. Além disso, a expressão aumentada de mTOR fosforilada nos músculos jovens e idosos que foram lesados e tratados com formoterol quando comparados aos somente lesados nos sugere que o efeito benéfico do formoterol na regeneração da estrutura muscular é mediada pela ativação da via não clássica β_2 adrenérgica. No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre a ativação da referida via mediada pelo agonista β_2 adrenérgico ainda não é bem conhecido. Um dos possíveis elementos envolvidos seria a ativação de AKT, porém pouco se sabe a respeito dos fatores envolvidos na ativação deste elemento, portanto futuros estudos são necessários para a melhor investigação dos elementos anteriores à ativação de mTOR induzida pela estimulação β_2 -adrenérgica nos músculos idosos em regeneração.

É bem estabelecido que mTOR exerce um papel importante na recomposição da massa muscular durante a regeneração (Ge et al., 2009). Considerando que a hipertrofia muscular induzida pelos agonistas β_2 está associada com a ativação de AKT (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010) e a fosforilação dos elementos alvos p70^{S6K} e 4EBP1 (Sneddon et al., 2001), o efeito benéfico do formoterol na restauração do tamanho das fibras musculares de músculos idosos em regeneração poderia ser devido a ativação aumentada de mTOR, possivelmente via ativação de PI3K/AKT. Os elementos envolvidos na ativação de AKT que desencadeiam a hipertrofia muscular induzida pela estimulação β_2 -adrenérgica não são bem conhecidos; é possível que ocorra devido ao acoplamento do adrenoceptor β_2 em $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$ -PI3K o que levaria a ativação de AKT e os elementos subsequentes como ocorre no coração (Kline et al., 2007) outra possibilidade seria que outros receptores de fatores de crescimento como o IGF-1 também poderiam ser ativados pelo tratamento com agonistas β_2 -adrenérgicos. Portanto, novas investigações são necessárias para investigar os elementos envolvidos na ativação de AKT/mTOR a partir da estimulação β_2 -adrenérgica. Finalmente, o tratamento com formoterol também poderia estar envolvido com a supressão das vias de degradação

protéica durante a regeneração de fibras musculares idosas, uma vez que tem sido descrito que os agonistas β_2 -adrenérgicos podem atuar como inibidores da degradação de proteínas por meio da inibição da proteólise dependente de cálcio (Navegantes et al., 2001; Koopman et al., 2010) e da transcrição de ubiquitina ligases E3 mediadas pelo fator de transcrição *forkhead box O* (FOXO) (Kline et al., 2007; Lynch e Ryall, 2008).

6 Conclusão

Nossos resultados demonstram que o tratamento com formoterol é capaz de melhorar a regeneração estrutural e funcional do músculo sóleo de ratos idosos. Além disso, nosso estudo sugere que esse efeito benéfico do formoterol sobre a fibra muscular de ratos idosos em regeneração é mediado pelo aumento da síntese protéica via ativação de mTOR. Esses achados contribuem para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na estimulação β_2 -adrenérgica no músculo esquelético e poderão servir de base para futuros estudos com intuito de melhorar a capacidade regenerativa da musculatura esquelética de indivíduos idosos.

REFERÊNCIAS¹

- Adamo ML, Farrar RP. Resistance training, and IGF involvement in the maintenance of muscle mass during the aging process. *Ageing Res Rev.* 2006;5(3):310-31.
- Always SE, Degens H, Lowe DA, Krishnamurthy G. Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscles of aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282(2):R411-22.
- Baptista J, et al. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(1):11-7.
- 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.
- 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.
- Bodine SC, 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. *Proc Nutr Soc.* 2004;63(2):351-6.
- Bricout VA, Serrurier BD, Bigard AX. Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. *Acta physiologica Scandinavica.* 2004;180(3):271-80.
- Buford TW, et al. Models of accelerated sarcopenia: critical pieces for solving the puzzle of age-related muscle atrophy. *Ageing Res Rev.* 2010;9(4):369-83.
- Burniston JG, Ng Y, Clark WA, Colyer J, Tan LB, Goldspink DF. Myotoxic effects of clenbuterol in the rat heart and soleus muscle. *J Appl Physiol.* 2002;93(5):1824-32.
- Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musaro A. Impact of ageing on muscle cell regeneration. *Ageing Res Rev.* 2011;10(1):35-42.
- Carter WJ, Lynch ME. Comparison of the effects of salbutamol and clenbuterol on skeletal muscle mass and carcass composition in senescent rats. *Metabolism: clinical and experimental.* 1994;43(9):1119-25.
- 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.
- Chen KD, Alway SE. Clenbuterol reduces soleus muscle fatigue during disuse in aged rats. *Muscle Nerve.* 2001;24(2):211-22.

¹ De acordo com: International Committee of Medical Journal International Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Clark DJ, Fielding RA. Neuromuscular contributions to age-related weakness. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011.
- Ciciliot S, Schiaffino S. Regeneration of mammalian skeletal muscle: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des*. 2010;16(8):906-14.
- Combaret L, Dardevet D, Bechet D, Taillandier D, Mosoni L, Attaix D. Skeletal muscle proteolysis in aging. *Curr Opin Clin Nutrition Metab Care*. 2009;12(1):37-41.
- Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell*. 2002;3(3):397-409.
- Conboy, IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*, 2003;302(5650):1575-7.
- Conte TC, et al. Radicol improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice. *Toxicon*, 2008;52(1):146-55.
- Degens H. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007;7(3):246-52.
- Delbeke FT, Desmet N, Debackere M. The abuse of doping agents in competing body builders in Flanders (1988-1993). *Int J Sports Med*. 1995;16(1):66-70.
- Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Deleterious effects of chronic clenbuterol treatment on endurance and sprint exercise performance in rats. *Clin Sci*. 2000;98(3):339-47.
- Dunser MW, Hasibeder WR. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. *J Intensive Care Med*. 2009;24(5):293-316.
- Faulkner JA, Brooks S V, Zerba E. Skeletal muscle weakness and fatigue in old age: underlying mechanisms. *Annu Rev Gerontol Geriatr*. 1990;10:147-66.
- 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.
- Filippin IL, Cuevas MJ, Lima E, Marroni NP, Gonzalez-Galego J, Xavier RM. Nitric oxid regulates the repair of injured skeletal muscle. *Nitric Oxide*, 2011;24(1):43-9.
- 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, 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.
- Ge Y, et al. mTOR regulates skeletal muscle regeneration in vivo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297(6):C1434-44.
- Gehrig SM, Koopman R, Naim, 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(1):29-33.
- Giresi PG, et al. Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics*. 2005;Apr 14;21(2):253-63.

- 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 U S A*. 2001;98(25):14440-5.
- Gosmanov AR, Wong JA, Thomason DB. Duality of G protein-coupled mechanisms for beta-adrenergic activation of NKCC activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(4):C1025-32.
- 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. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;854:78-91.
- Grounds MD, Yablonka-Reuveni Z. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol Cell Biol Hum Dis Ser*. 1993;3:210-56.
- 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. *J Biol Chem*. 1998;273(23):14484-94.
- Hara K, et al. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26457-63.
- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;91(2):534-51.
- 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.
- Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;287(4):C834-43.
- Janssen I. Evolution of sarcopenia research. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2010;35(5):707-12.
- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745-64.
- Jarvinen TA, et al. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007;21(2):317-31.
- Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet*. 1992;26:179-207.
- Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 524.
- Karagounis LG, Hawley JA. Skeletal muscle: increasing the size of the locomotor cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(9):1376-9.
- Karpati G, Carpenter S, Prescott S. Small-caliber skeletal muscle fibers do not suffer necrosis in mdx mouse dystrophy. *Muscle Nerve*. 1988;11(8):795-803.
- 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.

Kilts JD, Akazawa T, Richardson MD, Kwatra MM. Age increases cardiac Galpha(i2) expression, resulting in enhanced coupling to G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 2002;277(34):31257-62.

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.

Koopman R, et al. 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.

Larkin LM, Halter JB, Supiano MA. Effect of aging on rat skeletal muscle beta-AR function in male Fischer 344 x brown Norway rats. *Am J Physiol*. 1996;270:R462-8.

LeBrasseur NK, Walsh K, Arany Z. Metabolic benefits of resistance training and fast glycolytic skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(1):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(1):39-51.

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

Lexell J, Taylor CC, Sjoström M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci*. 1988;84(2-3):275-94.

Lieber RL. Skeletal muscle structure, function and plasticity: the physiological basis of rehabilitation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.369p.

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-Ilasaca M, et al. Requirement of phosphatidylinositol-3 kinase for activation of JNK/SAPKs by PDGF. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;232(2):273-7.

Lynch GS. Sarcopenia - age-related muscle wasting and weakness:mechanism and treatments. New York: Springer; 2011.480p.

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

MacIntosh BR, Gardiner PF, McComas AJ. Skeletal muscle : form and function. Champaign, IL: Human Kinetics; 2006.

Manini TM, Clark BC. Dynapenia and Aging: An Update. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011.

Martinez-Navarro JF. Food poisoning related to consumption of illicit beta-agonist in liver. *Lancet*, 1990;336(8726):1311.

Marzetti E, Leeuwenburgh C. Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Exp Gerontol*. 2006;41(12):1234-8.

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

- Mills S. Beta-adrenergic receptor subtypes mediating lipolysis in porcine adipocytes. Studies with BRL-37344, a putative beta3-adrenergic agonist. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2000;126:11-20.
- Miyabara EH, 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.
- Murphy KT, Cobani V, Ryall JG, Ibebunjo C, Lynch GS. Acute antibody-directed myostatin inhibition attenuates disuse muscle atrophy and weakness in mice. *J Appl Physiol*. 2011;110(4):1065-72.
- Nader GA, McLoughlin TJ, Esser KA. mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(6):C1457-65.
- Narici MV, Maffulli N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *Br Med Bull*. 2010;95:139-59.
- 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.
- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(3):E663-8.
- Newsholme P, Costa Rosa LF, Newsholme EA, Curi R. The importance of fuel metabolism to macrophage function. *Cell Biochem Funct*. 1996;14(1):1-10.
- Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct*. 2003;21(1):1-9.
- Passadore MD, Griggio MA, Nunes MT, Luz J. Effects of ageing on the energy balance of food-restricted rats. *Acta Physiol Scand*. 2004;181(2):193-8.
- Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Childs TE, Booth FW. Transcriptional profiling identifies extensive downregulation of extracellular matrix gene expression in sarcopenic rat soleus muscle. *Physiol Genomics*. 2003;15(1):34-43.
- 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.
- Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech*. 2000;50(6):500-9.
- Prather ID, Brown DE, North P, Wilson JR. Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(8):1118-21.
- Pullar CE, Manabat-Hidalgo CG, Bolaji RS, Isseroff RR. beta-Adrenergic receptor modulation of wound repair. *Pharmacol Res*. 2008;58(2):158-64.
- 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 (Pt 1):57-65.

- Rommel C, et al. 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.
- 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, 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, Schertzer JD, Lynch GS. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology.* 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(1):165-72.
- Salvini TF, Belluzzo SS, Selistre de Araujo 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.
- Sayer AA, Syddall HE, Martin HJ, Dennison EM, Roberts HC, Cooper C. Is grip strength associated with health-related quality of life? Findings from the Hertfordshire Cohort Study. *Age Ageing.* 2006;35(4):409-15.
- Schoenfeld BJ. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. *J Strength Cond Res.* 2010;24(10):2857-72.
- Schultz E, Lipton BH. Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 1982;20(4):377-83.
- Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1994;123:213-57.
- Serrano AL, Cánoves PM. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. *Exp Cell Res.* 2010;316(18):3050-8.
- Sillence MN, Matthews ML. Classical and atypical binding sites for beta-adrenoceptor ligands and activation of adenylyl cyclase in bovine skeletal muscle and adipose tissue membranes. *Br J Pharmacol.* 1994;111(3):866-72.
- Silva LH. Efeito do agonista β_2 -adrenérgico formoterol na regeneração muscular de ratos idosos. [dissertação (Mestrado em Ciências)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med.* 2008;38(11):947-69.
- 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.
- Spurlock DM, McDaneld TG, McIntyre LM. Changes in skeletal muscle gene expression following clenbuterol administration. *BMC genomics.* 2006;7:320.

Stirewalt WS, Low RB. Effects of insulin in vitro on protein turnover in rat epitrochlearis muscle. *Biochem J.* 1983;210(2):323-30.

Sugita 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.

Tasken, K.; Aandahl, E. M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 2004;84(1):137-67.

Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol.* 2010;224(1):7-16.

Thomson DM, Gordon S. E. Impaired overload-induced muscle growth is associated with diminished translational signalling in aged rat fast-twitch skeletal muscle. *The Journal of physiology.* 2006;574(Pt 1):291-305.

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

Tiidus PM. Skeletal muscle damage and repair. Champaign: Human Kinetics; 2008.337p.

Topinkova E. Aging, disability and frailty. *Ann Nutr Metab.* 2008;52 Suppl 1:6-11.

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

Welle S. Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. *Can J Appl Physiol.* 2002;27(1):19-41.

Wozniak AC, Kong J, BockE, 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.

Zhang W, 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.