## LUCILA HERNANDES DA SILVA

# EFEITO DO AGONISTA B<sub>2</sub>-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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elen Haruka Miyabara

Versão Original

#### **RESUMO**

Silva LH. Efeito do agonista  $\beta_2$ -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  $\beta_2$  em músculos de ratos idosos lesados poderia melhorar a regeneração destes. Ratos jovens e idosos foram tratados com injeção subcutânea do agonista  $\beta_2$ -adrenérgico formoterol (2  $\mu g/kg/dia$ ) 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  $\beta_2$ -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  $\beta 2$ -adrenoceptors in aged muscles following injury could improve their regenerative capacity. Young and aged rats were treated with a subcutaneous injection of  $\beta 2$ -adrenergic agonist formoterol (2  $\mu g/kg/day$ ) 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.

### INTRODUÇÃO

#### 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<sup>+</sup>) no meio intracelular, consequentemente 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.

#### 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.

# 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, TNFα) 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 suceptibilidade 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 reganho 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 TNFα 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  $\beta_2$ -adrenérgicos sintéticos, como é o caso, por exemplo, do clembuterol e do salbutamol e mais recentemente da nova geração de agonistas  $\beta_2$  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  $\beta_2$ -adrenérgicos no músculo esquelético e os principais efeitos da estimulação  $\beta_2$ -adrenérgica na musculatura esquelética.

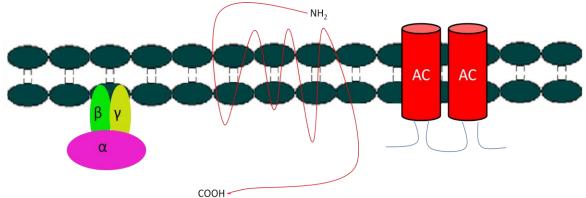
#### Adrenoceptores β<sub>2</sub> no músculo esquelético

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 ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ) e, atualmente pelo menos 9 subtipos de adrenoceptores são conhecidos (6 subtipos  $\alpha$ :  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$ ; 3 subtipos  $\beta$ :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ), 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  $\beta$ , em que se predomina o subtipo  $\beta_2$ , 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 proteincoupled receptor, família de GPCR), esta última é composta por 3 subunidades (Ga, Gβ, e Gγ) 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 (Gβγ) formam um dímero que permanece ligado à região intracelular da membrana plasmática e a subunidade α da proteína G (Gα), em seu estado inativo, formam a proteína heterotrimérica Gαβγ (Lynch, 2011; Lynch e Ryall, 2008) (Figura 1). A ativação de um adrenoceptor β<sub>2</sub> 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 Gα por um GTP, o que consequentemente desencadeia a dissociação da subunidade Gα (ligada ao GTP) do dímero Gβγ (Lynch, 2011; Lynch e Ryall, 2008) (Figura 2). A partir daí, ambas Gα-GTP e Gβy, são capazes de ativar diferentes cascatas de sinalização.

**Figura 1 -** Representação dos elementos da via de sinalização β<sub>2</sub>-adrenérgica localizados no sarcolema.



Adrenoceptor  $\beta_2$  com sete domínios transmembrânicos, uma terminação NH $_2$  extracelular e uma terminação COOH intracelular; Proteína G representada por suas subnidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  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  $\beta$  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 Gα<sub>s</sub>-AC-AMPc (Figura 2) é considerada a via de sinalização β<sub>2</sub>adrenérgica clássica, por ser a mais bem caracterizada e é responsável pelo menos
parcialmente pela hipertrofia muscular esquelética induzida pela ativação β<sub>2</sub>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 Gβγ
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 Gβγ, a PI3K é capaz de fosforilar PIP2 (*phospholipid phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*), 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-Ilasaca et al., 1997) (Figura 3). Em seguida PDK fosforila AKT (Lopez-Ilasaca et al., 1997) (Figura 3).

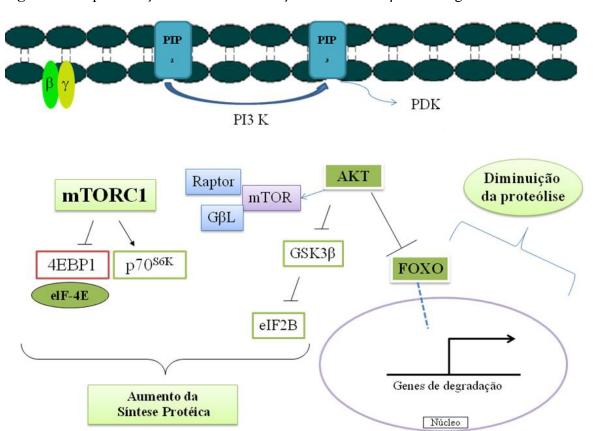
Agonista AC AC α GTP **EPAC AMPc** MEK/ ERK Proliferação Diferenciação Rap 1 **PKA** Diminuição de apoptose Aumento de síntese protéica calpaína PI3K **Diminui** a proteólise

**Figura 2 -** Representação da via de sinalização  $\beta_2$ -adrenérgica clássica:  $G\alpha_s$ -AC-AMPc.

A ativação do adrenoceptor  $\beta_2$  ocorre através da ligação do agonista no sítio de ligação do receptor, que resulta na associação da subunidade  $\alpha$  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<sub>2</sub>-adrenérgica, culminando predominantemente na indução de hipertrofia muscular (Lynch, 2011; Lynch e Ryall, 2008). Um estudo demonstrou que a estimulação β<sub>2</sub>-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 $\beta$ L (G protein  $\beta$ -subunit-like protein) formando o complexo mTORC1 (mTOR-raptor-GβL), 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).



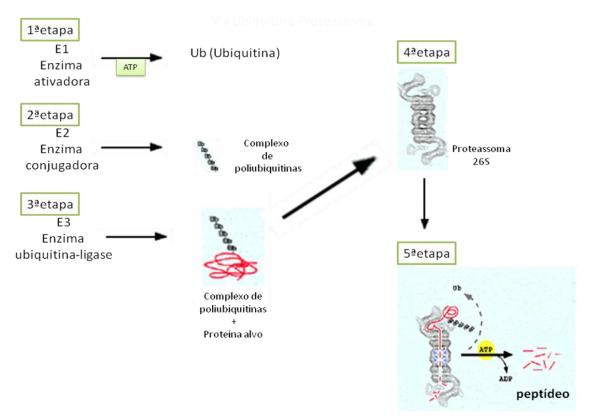
**Figura 3 -** Representação da via de sinalização não clássica β<sub>2</sub>-adrenérgica: PI3K/AKT.

O dímero Gβγ pode ativar PI3K que fosforila a PIP2 ligada à membrana plasmática e gera PIP3, criando sítios de ligação na membrana celular para a serina/treonina kinase AKT e para PDK. PDK fosforila AKT que resulta na ativação de mTOR que se associa a raptor e GβL formando o complexo mTORC1. S6K e 4EBP1 são alvos de mTORC1, a ativação de S6K e a inibição de 4EBP1 culmina no aumento de síntese protéica. AKT também atua inativando o fator glicogênio sintase quinase 3β (glycogen synthase kinase 3β, GSK3β) que acarreta na expressão do fator de iniciação eucariótico eiF2B favorecendo a síntese protéica. AKT fosforila o fator de transcrição forkhead box O transcription (FOXO), o que ibine a ação deste na ativação de genes envolvidos na degradação protéica 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 3β (glycogen synthase kinase 3β; GSK3β) (Bodine et al., 2001) e fator de transcrição forkhead box O (forkhead Box O transcription factors; FOXO) (Furuyama et al., 2002). GSK3β 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 GSK3β. O fator GSK3β normalmente atua inibindo a da tradução eiF2B (euchariotic 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 (ubiquitinaligases) 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  $\beta_2$ -adrenérgica tem sido estudado para testar os efeitos biológicos desses agonistas na musculatura esquelética. Já é bem estabelecido que os agonistas  $\beta_2$ -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<sub>2</sub>-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<sub>2</sub>-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<sub>2</sub>-adrenérgicos também induzem a conversão de fibras musculares do tipo I em fibras do tipo II (Ciciliot e Schiaffino, 2010).

O papel de agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos na regeneração muscular esquelética também tem sido investigado, estudos têm mostrado que o tratamento com o agonista  $\beta_2$ -adrenérgico clembuterol 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  $\beta$ -adrenérgicos seletivos e não seletivos para a isoforma  $\beta_2$ , 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  $\beta_2$ -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  $\beta_2$ -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<sub>2</sub>-adrenérgicos sintéticos, como é o caso do salmeterol e do formoterol, tem sido utilizada por ser mais seletiva aos adrenoceptores  $\beta_2$  e mais potente quando comparada à velha geração de agonistas  $\beta_2$ . Considerando-se que diferentemente do músculo esquelético (onde se predominam os adrenoceptores  $\beta_2$ ) o músculo cardíaco possui maior densidade de adrenoceptores  $\beta_1$ , agonistas mais seletivos à isoforma  $\beta_2$  do adrenoceptor proporcionam menores efeitos deletérios ao coração. De fato, doses menores (menores do que~25μg/Kg/dia) destes agonistas β<sub>2</sub> mais seletivos (formoterol e salmeterol) são capazes de induzir os mesmos efeitos benéficos musculares causados por altas doses (acima de ~1000 µg/Kg/dia) dos agonistas β<sub>2</sub>-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  $\beta_2$  do que à isoforma  $\beta_1$  do adrenoceptor) possui maior seletividade ao adrenoceptor β<sub>2</sub> do que o salbutamol (droga pertencente à velha geração de agonistas β<sub>2</sub>-adrenérgicos; KD do formoterol=8,12 versus KD do salbutamol= 6,44) e tem sido o agonista β<sub>2</sub>-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 µg/Kg/dia a 25 µg/kg/dia) são capazes de induzir hipertrofia muscular significativa (Ryall et al., 2006) e também minimizar a perda de massa 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  $\beta_2$ -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  $\beta_2$ -adrenérgicos sobre a atenuação do déficit regenerativo muscular em indivíduos idosos; esse estudo visa explorar o papel do agonista  $\beta_2$ -adrenérgico formoterol em aspectos histológicos, moleculares e funcionais da regeneração do músculo sóleo de ratos idosos.

#### 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<sub>2</sub>-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<sub>2</sub>-adrenérgica no músculo esquelético em regeneração e investigar o possível efeito benéfico do tratamento com o agonista β<sub>2</sub>- adrenérgico formoterol em atenuar o déficit regenerativo muscular em ratos idosos.

#### 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  $\beta_2$ -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, Quattrocelli 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.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> De acordo com: International Committee of Medical Journal Internacional Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Avaiable from: <a href="http://www.icmje.org">http://www.icmje.org</a> [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, RandoTA. 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. Radicicol 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, FKHRL1, 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, Sjostrom 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 agerelated 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  $\beta_2$ -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.