



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Ronaldo Luís Abdalla Silva

Participação dos receptores β_2 -adrenérgicos na expressão de genes tróficos da musculatura esquelética em resposta ao exercício resistido

Uberaba – MG

2023

Ronaldo Luís Abdalla Silva

Participação dos receptores β_2 -adrenérgicos na expressão de genes tróficos da musculatura esquelética em resposta ao exercício resistido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração I: Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wilian de Assis Silveira.

Uberaba – MG

2023

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro**

S583p Silva, Ronaldo Luís Abdalla
Participação dos receptores β 2-adrenérgicos na expressão de genes
tróficos da musculatura esquelética em resposta ao exercício resistido /
Ronaldo Luís Abdalla Silva. -- 2023.
85 f. : il., graf.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023
Orientador: Prof. Dr. Wilian de Assis Silveira

1. Músculo esquelético. 2. Treinamento de força. 3. Receptores adrenérgicos. 4. Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico. 5. Expressão gênica I. Silveira, Wilian de Assis. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 612.746

Ronaldo Luis Abdalla Silva

Participação dos receptores β_2 -adrenérgicos na expressão de genes atróficos da musculatura esquelética em resposta ao exercício resistido

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração I - Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Wilian de Assis Silveira

Uberaba, 4 de agosto de 2023.

Banca Examinadora

DR. WILIAN DE ASSIS SILVEIRA
Orientador - UFTM

DR. LUIZ CARLOS CARVALHO NAVEGANTES
FMRP / USP

DR. DAWIT ALBIEIRO PINHEIRO GONÇALVES
UFMG



Documento assinado eletronicamente por WILIAN DE ASSIS SILVEIRA, Professor do Magistério Superior, em 04/08/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por LUIZ CARLOS CARVALHO NAVEGANTES, Usuário Externo, em 08/08/2023, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves, Usuário Externo, em 09/08/2023, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1046243 e o código CRC 40F0F5E4.

DEDICATÓRIA

Este trabalho, bem como todo esforço e paciência nele contidos, é dedicado aos meus pais, irmã e avó, ao meu namorado e a todos os meus amigos. Também àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos, gratidão a Deus. Porque é por meio da sua intervenção que alcanço todas as graças.

Gratidão aos meus pais, João Carlos e Maria Cristina, por toda dedicação, zelo, paciência, esforço e por se desdobrarem em milhões para que esse ciclo se finalizasse. À minha irmã Ana Alice pela inspiração e base em toda minha trajetória. À minha avó Marilda, que sempre acreditou e rezou pelo meu sucesso. Não há palavras para agradecer o suficiente. Vocês são o elo de amor que me sustenta e motiva. O amor de vocês é o maior presente que já recebi na vida. Essa conquista é para vocês. Eu amo vocês!

Ao meu namorado, Carlos. Por toda sua paciência, seu ombro amigo, suas palavras de ânimo e conforto e por todo seu amor. Você fez dessa caminhada mais leve e se fez apoio quando me senti cansado. Com você eu sei que posso ir mais longe. Obrigado por tudo. Eu amo você!

Ao meu orientador Doutor Wilian de Assis Silveira, por toda paciência e dedicação. Poucas pessoas têm a chance de ter um orientador com tanta boa vontade e disposição, com tanto empenho para fazer dar certo. Mais que um orientador, um amigo. Estendendo meu agradecimento também à sua esposa Vivian Tragante, por sua amizade e generosidade. Aos dois, obrigado por tudo!

Aos professores Dr. Luiz Carlos Navegantes e Dr^a Ísis do Carmo Kettelhut que abriram as portas do seu estimado laboratório na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e possibilitaram o avanço em minha pesquisa. Estendo também às amizades formadas e experiências compartilhadas com os integrantes deste laboratório. Gratidão.

Aos meus colegas do PPGCF, gratidão e votos de sucesso a todos.

Aos professores do programa, à secretária Elisabete Ambrosio e todos os técnicos dos laboratórios da UFTM, os quais souberam tão generosamente dividir seus conhecimentos.

Por último, porém com importância extrema, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para que eu pudesse ter condições de realizar todas as minhas atividades na pós-graduação para o desenvolvimento deste trabalho. Lembrando, ainda, de sua importância para a ciência no âmbito nacional.

O homem não é nada além daquilo
que a educação faz dele.

Immanuel Kant

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do processo de ubiquitinação e degradação de substrato pelo complexo multienzimático do Proteassoma.....	11
Figura 2	Representação esquemática do processo macroautofágico de entrega de substratos proteicos ao Lisossomo.....	13
Figura 3	Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt e sua relação com a síntese e degradação de proteínas.....	14
Figura 4	Representação esquemática da interação de AMPK e p38-MAPK na via de sinalização PI3K/mTOR.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilil ciclase
ADMX	Adrenodemedulação
ADR	Adrenalina
Akt/PKB	Proteína quinase B
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Atg	Autophagic gene
ATP	Adenosina trifosfato
Atrogin-1/MAFbx	Muscle Atrophy F-box
C α	Subunidade catalítica alfa da PKA
Ca ²⁺	Cálcio
CBP	Proteína de ligação ao CREB
CR	Subunidade regulatória da PKA
CRE	Elemento responsivo ao AMPc
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
DEXA	Dexametasona
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
E1	Enzima ativadora de ubiquitina
E2	Enzima carreadora de ubiquitina
E3	Enzima ligante de ubiquitina
FoxO	Forkhead box class O
GC	Glicocorticóides
Gs	Proteína G estimulatória
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
Gabarap	Aminobutyric acid receptor-associated protein
IGF-1	Fator de Crescimento semelhante à Insulina-1
IGF-1R	Receptor de IGF-1
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
mTOR	Mammalian target of rapamycin

MuRF1	Muscle ring finger 1
MSNA	Atividade nervosa simpática muscular
MSTN	Miostatina
NE	Noradrenalina
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
PAF	Pré-autofagossomo
PGC-1 α	Peroxisome proliferative activated receptor gama, coactivator 1 alpha
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
p38-MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno P38
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
SNS	Sistema nervoso simpático
S6K1	Proteína ribossômica S6 quinase beta-1
SIK1	Salt-inducible kinase 1
SMADs	Mothers against decapentaplegic
Ub	Ubiquitina
UPS	Sistema Ubiquitina-proteassoma
4EBP1	Proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 1

RESUMO

Embora a estimulação do sistema nervoso simpático (SNS) seja uma resposta bem estabelecida durante o exercício, a participação das catecolaminas nas mudanças induzidas pelo exercício resistido (RE) no metabolismo de proteínas do músculo esquelético permanecem obscuras. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do bloqueio dos receptores β_2 -adrenérgico (β_2 -AR) nas respostas moleculares agudas induzidas por uma única sessão de RE em músculos esqueléticos de roedores. Camundongos machos C57BL6/J foram submetidos a uma única sessão de RE progressivo em uma escada vertical sob bloqueio específico dos β_2 -AR com ICI 118,551 (ICI; 10 mg.kg⁻¹, i.p.) ou veículo (solução salina estéril; 0,9%, i.p.). A expressão gênica e o estado de ativação de proteínas sinalizadoras intracelulares foram analisadas nos músculos tibial anterior (TA) e/ou gastrocnêmio (GAS) por meio das técnicas de RT-qPCR e Western Blot, respectivamente. Demonstramos que os níveis circulantes dos hormônios associados ao estresse, norepinefrina (NE) e corticosterona encontravam-se elevados imediatamente após a sessão de RE, assim como os níveis de fosforilação de AMPK, p38-MAPK e CREB apenas nos músculos GAS. O aumento agudo nos níveis de fosforilação de CREB foi acompanhado pela regulação positiva dos genes-alvo de CREB, *Sik1* e *Nr4a3*, três horas após a sessão de RE. Por outro lado, o bloqueio dos β_2 -AR preveniu totalmente o aumento de *Sik1* e atenuou a expressão de *Nr4a3*. Além disso, uma única sessão de RE estimulou a expressão de genes relacionados à autofagia (*Map1lc3b* e *Gabarapl1*) e miostatina (*Mstn*), mas não alterou a expressão de *Igf-1* ou *Il-6*. Por outro lado, os genes relacionados à atrofia (*Murf1* e *Atrogin-1*), assim como o conteúdo proteico de Atrofin-1, estavam aumentados apenas nos músculos dos camundongos exercitados sob bloqueio dos β_2 -AR. Curiosamente, o aumento na expressão de *Mstn* foi amplificado nos músculos dos camundongos exercitados sob bloqueio dos β_2 -AR. Em conclusão, nossos dados sugerem que o RE agudamente aumenta a expressão de genes envolvidos no controle do metabolismo de proteínas musculares e que pelo menos parte das alterações moleculares dependem da ativação de β_2 -ARs.

Palavras-chave: exercício resistido, β_2 -adrenoceptor, músculo esquelético, CREB, expressão gênica

ABSTRACT

Although stimulation of the sympathetic nervous system (SNS) is a well-established response during exercise, the role of catecholamines in resistance exercise (RE)-induced changes in skeletal muscle protein metabolism remains unclear. This study investigated the effects of β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) blockade on the acute molecular responses induced by a single RE session in skeletal muscles of rodents. Male C57BL6/J mice underwent a single session of progressive RE on a vertical ladder under β_2 -AR blockade with ICI 118,551 (ICI; 10 mg.kg⁻¹, i.p.) or vehicle (sterile saline; 0.9%, i.p.) and gene expression analyzed in tibialis anterior (TA) and/or gastrocnemius (GAS) muscles. We demonstrated that a single RE session acutely increased circulating levels of the stress-associated hormones norepinephrine (NE) and corticosterone and levels of AMPK, p38-MAPK and CREB phosphorylation only in GAS muscles. The acute increase in CREB phosphorylation levels was accompanied by upregulation of CREB target genes *Sik1* and *Nr4a3*. 3h after the RE session. On the other hand, β_2 -AR blockade completely prevented the *Sik1* increase and attenuated *Nr4a3* mRNA levels. Furthermore, a single RE session stimulated mRNA levels of genes related to autophagy (*Map1lc3b* and *Gabarapl1*) and myostatin, but did not alter gene expression of *igf-1* or *il-6*, while genes related to atrophy (*Murf1* and *Atrogin-1*) were increased only in mice under β_2 -AR blockade. Interestingly, performing a single RE session under β_2 -AR blockade amplified the increase in myostatin mRNA levels in GAS muscles of exercised mice. In conclusion, our data suggest that at least part of the acute molecular changes induced by RE depend on the activation of β_2 -ARs in skeletal muscle.

Keywords: resistance exercise, β_2 -adrenoceptor, skeletal muscle, CREB, gene expression

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 SISTEMAS PROTEOLÍTICOS INTRACELULARES NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA.....	10
1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO NO CONTROLE DO METABOLISMO PROTEICO....	13
1.3 PARTICIPAÇÃO DA MIOSTATINA E INTERLEUCINA-6 NA MODULAÇÃO PROTEICA	16
1.4 A VIA DE SINALIZAÇÃO ADRENÉRGICA NO CONTROLE DO METABOLISMO PRÓTEICO	18
1.5 O EXERCÍCIO FÍSICO COMO MODELO FISIOLÓGICO DE HIPERATIVAÇÃO ADRENÉRGICA	20
1.6 O ESTRESSE MECÂNICO AGUDO E SINALIZAÇÕES PROTEICAS ATIVADAS DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO	21
1.7 PRINCIPAIS GENES ENVOLVIDOS COM A PLASTICIDADE E ADAPTAÇÃO MUSCULAR, MODULADOS PELO EXERCÍCIO E/OU PELO RECEPTOR B ₂ -ADRENÉRGICO.	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS.....	26
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL	27
3.3 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO RESISTIDO	28
3.4 ANÁLISE DE CATACOLAMINAS E CORTICOSTERONA	28
3.5 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING	29
3.6 QUANTIFICAÇÃO POR qPCR	29
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE A – ARTIGO	41
APÊNDICE B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	81

1 INTRODUÇÃO

Dentre os vários fascínios com o corpo humano, o estudo anatômico e funcional da musculatura esquelética sempre se manteve em foco ao decorrer da história. Compreendendo quase metade da massa corporal total de um indivíduo, o músculo esquelético é caracterizado por sua atividade mecânica para a realização de movimento, sustentação postural e respiração, a qual depende da contração de diferentes tipos de fibras musculares (Bell RAV, Al-Khalaf M, Megeney LA, 2008). Atualmente, no entanto, o músculo esquelético é considerado mais do que apenas um componente do nosso sistema locomotor, uma vez que este tecido contribui significativamente para a produção de calor e a homeostase metabólica. Nesse sentido, evidências recentes identificaram o músculo esquelético como um tecido endócrino que sintetiza e secreta diversas citocinas e outros peptídeos, denominados de “miocinas” (Pedersen BK 2013; Schnyder S, Handschin C, 2015). Elas, por sua vez, exercem seus efeitos de forma autócrina, parácrina e/ou endócrina e, portanto, influenciam o metabolismo e a função do próprio tecido muscular, assim como de outros tecidos e órgãos distantes (Pedersen BK 2013).

Devido a essas múltiplas ações, a regulação da massa e da função muscular são temas de grande interesse na área da saúde. Nesse contexto, estudos recentes apontam uma íntima relação entre a massa/força muscular e a morbidade/mortalidade de indivíduos saudáveis e acometidos por diversas doenças debilitantes. De fato, a perda de massa muscular (atrofia) associada ao envelhecimento (sarcopenia), ao câncer (caquexia), à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), entre outras doenças, são preditores da perda de função física e mortalidade nesses pacientes (Santana FM et al., 2019; Roubenoff R, Hughes VA, 2000; Tisdale MJ, 2005; Mathur S, Brooks D, Carvalho CR, 2014). Apesar desses dados alarmantes, ainda não há tratamento efetivamente capaz de prevenir a atrofia muscular, destacando-se a importância da pesquisa básica atuando na identificação de possíveis novos mecanismos de controle e alvos terapêuticos.

Sabe-se que o citoplasma das fibras musculares esqueléticas é constituído principalmente de proteínas contráteis (e.g. miosina e actina) envoltas por organelas, em especial mitocôndrias e o retículo sarcoplasmático. Assim, a renovação destas estruturas intracelulares impacta sobre o volume e a função da fibra muscular (Sartori R, Romanello V, Sandri M, 2021). Reforçando essa ideia, em resposta à ação de

hormônios anabólicos ou exercício de força (resistido) observa-se um aumento no volume da fibra muscular (hipertrofia) devido à estimulação do processo de síntese e, conseqüentemente, acúmulo de novas proteínas e organelas em seu citoplasma (Yoshida T, Delafontaine P, 2020; Baar K, Nader G, Bodine SC et al., 2006). Por outro lado, em condições catabólicas como o câncer, diabetes e o excesso de glicocorticoides, ocorre redução no volume dessas fibras musculares (atrofia) como consequência das elevadas taxas de degradação proteica (Bonaldo P, Sandri M, 2013). Portanto, embora seja possível apontar que uma redução na síntese proteica possa contribuir para a perda de massa muscular, é de consenso que o aumento da atividade dos sistemas proteolíticos na degradação total de proteínas, estimulados por vários fatores extrínsecos e intrínsecos reflete de forma mais intensa na redução/atrofia desse tecido.

O exercício físico realizado de forma regular (i. e. treinamento físico) agrega diversas melhorias psicossociais em seus praticantes e é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina e a densidade mineral óssea, enquanto que o aperfeiçoamento de alguns parâmetros específicos, como mudança do tipo de fibra, depende da modalidade de exercício praticada (Egan B, Zirath JR, 2013; Shestack R, 1987). Interessante notar que em ambos extremos das principais modalidades de exercício (resistido e aeróbio) a hiperatividade simpática e as adaptações benéficas ao organismo são pontos em comum. Apesar disso, pouco se conhece sobre a contribuição fisiológica do SNS nas alterações do metabolismo proteico provocadas pelo exercício físico. Assim, o modelo fisiológico de hiperativação simpática escolhido nesse projeto foi o exercício resistido (RE), uma vez que essa modalidade de exercício induz aumentos mais pronunciados nas catecolaminas plasmáticas e musculares (Egan B, Zirath JR, 2013; Katayama K, Saito M, 2019), além de ser mais efetivo, a longo prazo, em aumentar a massa muscular esquelética através do treinamento físico (Khamoui AV et al., 2016; Kim JS et al. 2016; Padilha CS et al. 2021). Assim, levantamos a hipótese de que a liberação de catecolaminas durante o RE modula a expressão de genes tróficos de maneira dependente de β_2 -AR do músculo esquelético. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do bloqueio específico dos β_2 -ARs nas respostas moleculares agudas induzidas por uma única sessão de RE em músculos esqueléticos de roedores. Demonstramos que o RE aumenta agudamente a expressão de genes envolvidos no controle do metabolismo de proteínas musculares e que pelo menos parte dessas alterações dependem da

ativação dos β_2 -ARs. Finalmente, o desdobramento deste projeto de pesquisa permitiu o aprofundamento nos estudos relacionados ao controle do metabolismo proteico muscular pelo SNS.

1.1 SISTEMAS PROTEOLÍTICOS INTRACELULARES NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA

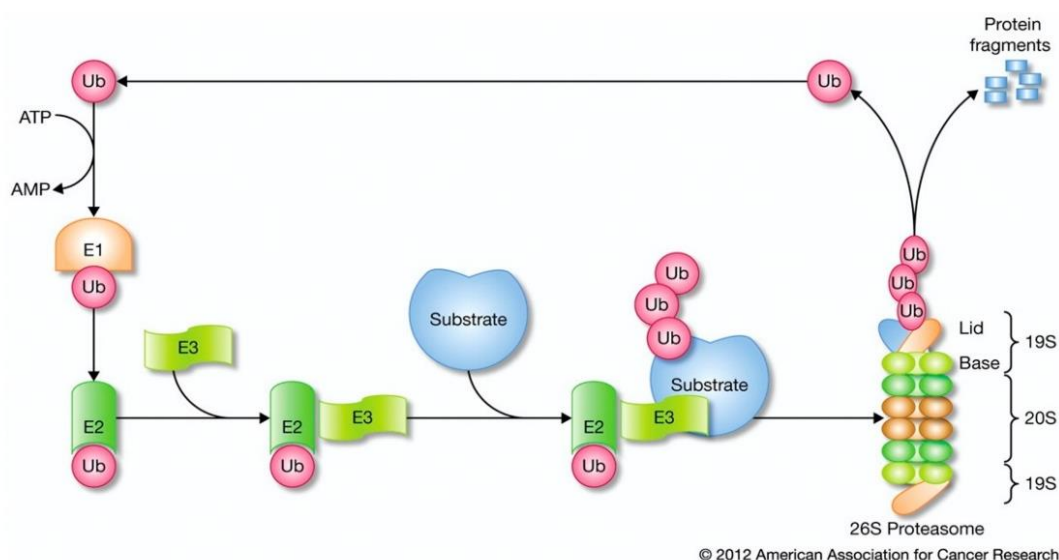
Sabemos atualmente que existem pelo menos três sistemas proteolíticos envolvidos no processo de renovação de proteínas intracelulares do músculo esquelético: o sistema proteolítico dependente de cálcio (Ca^{+2}), o sistema proteolítico dependente de Ubiquitina (Ub)-proteassoma (UPS) e o sistema autofágico/lisossomal (Goll DE et al., 2008; Aweida D, Cohen S, 2021). A atividade conjunta destes sistemas é de fundamental importância para a manutenção da homeostase celular, uma vez que estão envolvidos no processamento de antígenos, na remoção de proteínas anormais, degradação de proteínas regulatórias de meia-vida curta (e.g., fatores de transcrição) e meia-vida longa (e.g., proteínas miofibrilares), assim como para o fornecimento de aminoácidos para outros processos metabólicos (Lecker, Goldberg e Mitch, 2006). Além disso, também atuam na reciclagem de receptores de membrana, no ciclo celular, crescimento e diferenciação e na liberação de aminoácidos para a gliconeogênese, entre outras funções (Lecker SH et al., 1999). Entretanto, sob estímulos catabólicos, o aumento sustentado da degradação proteica, principalmente por meio da hiperativação dos sistemas proteassomal e lisossomal, pode levar ao quadro de atrofia muscular.

O UPS é o principal sistema presente na musculatura esquelética (Lecker, Goldberg e Mitch, 2006). Para que os substratos possam ser degradados pelo proteassoma é necessário que estes sejam inicialmente ligados covalentemente a uma proteína de 76 aminoácidos chamada de ubiquitina (Ub). A ligação da Ub, por sua vez, depende da ação de três famílias de enzimas: a E1 ou enzima ativadora, a E2 ou enzima carreadora e a E3 ou Ub-ligase. A Ub-ligase é a enzima limitante de todo o processo de ubiquitinação, pois esta tem a capacidade de reconhecer especificamente os substratos proteicos a serem degradados e de ligá-los à Ub sucessivamente, formando complexos poliubiquitinados. Uma vez poliubiquitinado, o substrato-alvo pode ser reconhecido e degradado pelo proteassoma 26S (Ciechanover A et al., 1980; Jackman RW, Kandarian SC, 2004), um complexo

multienzimático presente no citosol de todas as células que é constituído por uma estrutura central 20S, e duas subunidades periféricas 19S (Figura 1).

Dentre as diferentes Ub-ligases, as mais estudadas são a MuRF1 (*Muscle Ring Finger protein 1*) e a Atrogin-1 (*Muscle Atrophy F-box*) (Glass DJ, 2003), uma vez que são expressas exclusivamente nos músculos estriados (esquelético e cardíaco) e participam de um programa gênico atrófico que precede a atrofia muscular (Lecker SH et al., 2004). A importância fisiopatológica da hiperexpressão destas Ub-ligases para estabelecimento da atrofia muscular foi demonstrada em experimentos nos quais a atrofia muscular induzida pelo modelo de desnervação motora foi parcialmente bloqueada em músculos de animais *knockout* para ambas as Ub-ligases (Bodine SC et al., 2001a), sendo consideradas marcadoras de atrofia muscular em diversos modelos experimentais (Bodine SC et al., 2001b; Gomes MD et al., 2001). Assim, faz-se necessário compreender como os marcadores da ativação desse sistema comportam-se em um modelo de hipertrofia muscular.

Figura 1 - Representação esquemática do processo de ubiquitinação e degradação de substrato pelo complexo multienzimático do proteassoma.



Fonte: Adaptado de Rahimi N, 2012.

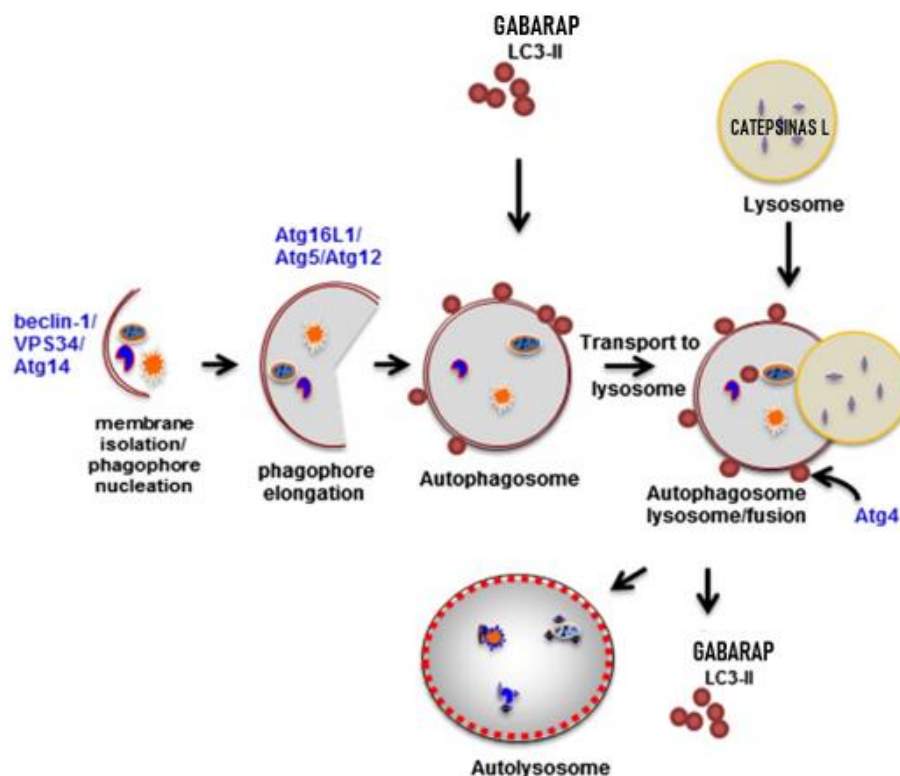
Nota: Ub, ubiquitina; E1, enzimas ativadoras de Ub; E2, enzimas carreadoras de Ub; E3, enzimas ligadoras de Ub.

No sistema proteolítico autofágico/lisossomal, os lisossomos são as organelas envolvidas no processo de degradação de grande parte das proteínas extracelulares

e de membrana endocitadas, proteínas citoplasmáticas e até mesmo organelas inteiras (Tanida I, Ueno T, Kominami E, 2004). Essas vesículas delimitadas por membrana contêm em seu interior as enzimas responsáveis pela sua capacidade proteolítica, conhecidas como catepsinas (B, D, H e L). No entanto, existem diferentes vias de entrega de substratos ao lisossomo, como a microautofagia, a autofagia mediada por chaperonas e a macroautofagia (Bechet D et al., 2005). Dentre essas, a macroautofagia (ou apenas, autofagia) parece ser a via de entrega de substratos mais importante na musculatura esquelética.

O início do processo autofágico depende da formação de uma vesícula de membrana dupla que engloba porções inteiras do citoplasma junto com vários substratos e os entrega ao lisossomo para que assim sejam degradados (Figura 2). Neste processo, o complexo fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) de classe III, beclina e o conjugado das proteínas autofágicas Atg5-Atg12 são necessários para a geração da estrutura do pré-autofagossomo (PAF). Além disso, a conjugação de lipídios às Atg8, LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) e GABARAP (*γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*), parece ser o evento decisivo para o alongamento e expansão da membrana de isolamento do PAF (Bechet D et al., 2005). Após a formação do autofagossomo, a membrana externa dessa estrutura se funde ao lisossomo, formando o autolisossomo, onde haverá a degradação das proteínas por ação das hidrolases ácidas (Bechet D et al., 2005). Há evidências de que a hiperexpressão de genes autofágicos também esteja diretamente associada à atrofia das fibras musculares (Mammucari C et al., 2007; Zhao J et al., 2007). Assim, a expressão dos genes das proteínas autofágicas LC3 e GABARAP, os quais possuem papel fisiológico importante no processo de formação do autofagossomo, têm sido utilizados como marcadores de autofagia em diversos tecidos, inclusive na musculatura esquelética atrofica (Mammucari C et al., 2007; Ogata T et al., 2010). Assim como no USP, esse sistema também é estimulado com o ambiente catabólico promovido pelo RE, todavia, pouco se conhece da relação que esses marcadores possuem agudamente após o exercício, bem como a interação dos β_2 -AR.

Figura 2 - Representação esquemática do processo macroautofágico (autofagia) de entrega de substratos ao lisossomo.



Fonte: Adaptado de Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL, 2014.

Nota: Atgs, proteínas autofágicas; Gabarap, Aminobutyric acid receptor-associated protein; LC3, Microtubule-associated protein light chain 3.

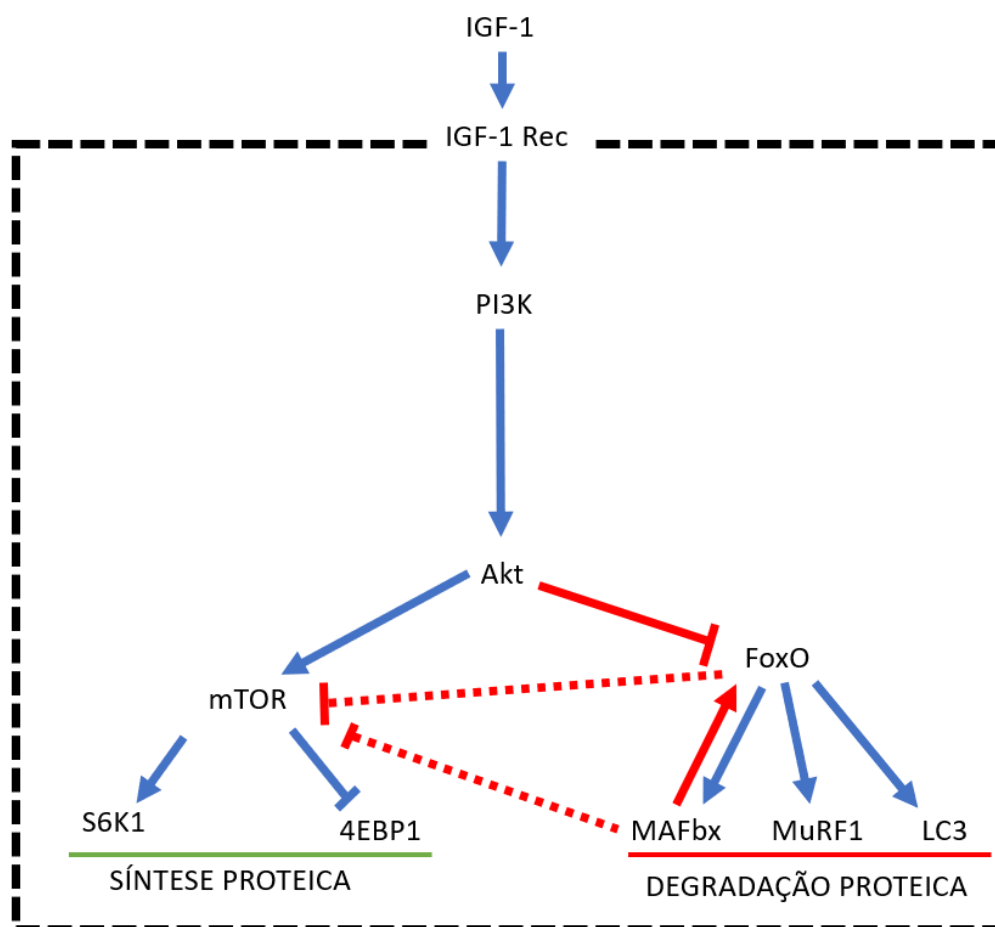
1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO NO CONTROLE DO METABOLISMO PROTEICO

Nos últimos anos as vias de sinalização intracelular envolvidas no controle do metabolismo proteico têm sido bastante investigadas no músculo esquelético (Sartori R et al., 2021; Glass DJ, 2003; Sandri M, 2008). Nesse sentido, a ativação de uma das vias mais estudadas se inicia com a atuação de hormônios anabólicos como a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1). Esses hormônios atuam na fibra muscular por meio da ligação com seus receptores transmembrana, com atividade tirosina quinase intrínseca, e ativam a cascata de sinalização da fosfaditilinositol-3-quinase classe I (PI3K) e proteína quinase B (Akt) (Figura 3). A Akt possui atividade serina (Ser)/treonina (Thr) quinase e é considerada uma enzima-chave no controle da massa muscular (Bodine SC et al., 2001a; Glass DJ, 2003; Sandri M, 2008). Uma vez ativada por fosforilação em resíduos específicos (Ser 473 e Thr 308) a Akt passa a fosforilar proteínas envolvidas na estimulação da síntese

proteica, como a mTOR (mammalian target of rapamycin) e seu substrato p70S6K (S6K1).

Além de suas ações no processo de síntese, essa via de sinalização também favorece o anabolismo muscular por meio do controle da atividade dos sistemas de degradação de proteínas intracelulares. Assim, em situações normais, a Akt ativada também fosforila os fatores de transcrição FoxO (Forkhead box class O) em resíduos específicos, os quais se associam as proteínas 14-3-3 no citoplasma, impedindo a translocação desses fatores para o núcleo e, conseqüentemente, a transcrição das Ub-ligases (*Atrogin-1* e *MuRF-1*) e das proteínas autofágicas (*Map11c3b* e *Gabarapl1*) (Sandri M et al., 2004; Zhao J et al., 2007). Por outro lado, em situações atroficas como no jejum, diabetes ou tratamento com glicocorticoides, a inativação/supressão da cascata de sinalização da Akt diminui os níveis de fosforilação de FoxO e favorece sua translocação para o núcleo e a transcrição gênica (Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP, 2004; Schakman O et al., 2013). Dessa forma, acredita-se que os sistemas proteolíticos autofágico/lisossomal e dependente de Ub-proteassoma sejam regulados por uma mesma via de sinalização envolvendo Akt/FoxO (Figura 3) (Zhao J et al., 2007). Embora a sinalização intracelular IGF-1/Akt seja a mais estudada e conhecida sinalização anabólica no músculo esquelético, numerosos estudos tem demonstrado que a ativação de receptores adrenérgicos do tipo β , principalmente do subtipo 2 (β_2), promove hipertrofia e atenua a atrofia muscular (Yimlamai T et al., 2005; Gonçalves DA et al., 2012; Berdeaux R, Stewart R, 2012; Lynch GS, Ryall JG, 2008).

Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização PI3K/Akt e sua relação com a síntese e degradação de proteínas.



Fonte: Adaptada de Schiaffino S, Mammucari C, 2011.

Nota: IGF-1, Fator de crescimento semelhante a insulina 1; IGF-1 Rec, Receptor de IGF-1; PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; Akt, proteína quinase B; mTOR, Mammalian target of rapamycin; S6k1, proteína ribossômica S6 quinase beta-1; 4EBP1, proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 1; FoxO, Forkhead box class O; MAFbx, Muscle Atrophy F-box; MuRF1, Muscle ring finger 1; LC3, Microtubule-associated protein light chain 3. Setas em azul indicam estimulação e setas em vermelho inibição; setas pontilhadas indicam efeito indireto.

Outra via também importante para o controle do metabolismo proteico é a via da proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2), também conhecida como MAPK (mitogen-activated protein kinase) 1/2, que desempenha um papel importante na regulação da musculatura esquelética. As ERK 1/2 são parte da cascata de sinalização intracelular e são ativadas em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, hormônios e estresse mecânico, desempenhando um papel crucial no crescimento e na hipertrofia muscular (Boyer *et al.*, 2019). Quando ativadas, elas sinalizam para as células musculares a síntese de proteínas musculares, o que leva ao aumento do tamanho e da massa muscular em resposta ao treinamento de resistência e estímulos de crescimento (Boyer *et al.*, 2019). Como salientado acima, as ERK 1/2 podem ser ativadas por hormônios, como

a insulina e o IGF-1, que desempenham um papel importante na regulação do metabolismo e no crescimento muscular. Além disso, o estresse mecânico pode diretamente estimular as ERK1/2 na musculatura esquelética, em particular durante o exercício resistido, e participar do processo de adaptação do músculo frente ao treinamento de força (Boyer *et al.*, 2019; Richter *et al.*, 2004).

Por fim, outras duas proteínas que desempenham papéis importantes na regulação da musculatura esquelética, especialmente durante o exercício físico, são a proteína p70S6 (também conhecida como ribossomal proteína S6 quinase 1 ou S6K1) e a GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 beta) que fazem parte da cascata de sinalização que controla a síntese de proteínas musculares e regulam tanto o crescimento, quanto a adaptação muscular. Quando ativada, p70S6K sinaliza para as células musculares aumentarem a síntese de proteínas, fator importante durante o exercício de resistido, uma vez que as fibras musculares sofrem microlesões e precisam se reparar e crescer para se adaptar ao estresse (McGlory *et al.*, 2014). Já a proteína GSK3 β atua como reguladora do metabolismo de glicogênio no músculo esquelético, uma vez que ela inibe a glicogênio sintase, enzima responsável por sintetizar o glicogênio a partir da glicose, o que leva à quebra do glicogênio armazenado em glicose, fornecendo uma fonte de energia rápida durante o exercício intenso (Markuns, Wojtaszewski e Goodyear, 1999). Durante o exercício físico, a regulação da GSK3 β também influencia a resposta adaptativa do músculo esquelético, visto que ela está envolvida na sinalização IGF1/mTOR que promove a hipertrofia muscular e outras adaptações, como a regulação da expressão de genes relacionados ao crescimento e à síntese de proteínas musculares citados anteriormente (Sakamoto *et al.*, 2004).

1.3 PARTICIPAÇÃO DA MIOSTATINA E INTERLEUCINA-6 NA MODULAÇÃO PROTEICA

Miocinas são um grupo de proteínas produzidas e liberadas por células musculares, especialmente células musculares esqueléticas (músculos que se movem voluntariamente), em repouso e durante a contração muscular. Elas desempenham um papel crucial na regulação do metabolismo, no controle da inflamação, na promoção do crescimento muscular e na comunicação entre o músculo

esquelético e outros sistemas do corpo (Barbalho *et al.*, 2020). Desempenhando importante papel na saúde geral e na adaptação do corpo ao exercício físico, bem como na resposta a lesões musculares.

A miostatina (MSTN), também conhecida como GDF-8 (Fator de Crescimento/Diferenciação 8), é uma proteína que participa no controle da plasticidade muscular, principalmente na inibição do crescimento excessivo do tecido muscular, sendo, por isso, conhecida como uma reguladora negativa do crescimento muscular (Planella-Farrugia *et al.*, 2019). A MSTN regula a expressão gênica e a função muscular através da ativação receptor tipo IIB de activina (ActRIIB). Para isso, uma proteína co-receptora chamada betaglicano auxilia a ligação da MSTN ao seu receptor principal (ActRIIB), presente na superfície das células musculares (Barbalho *et al.*, 2020; Planella-Farrugia *et al.*, 2019). Após a ligação da MSTN ao receptor ActRIIB, receptor ocorre a ativação dos fatores de transcrição, em particular, Smad2 e Smad3, (Esposito *et al.*, 2022). que se difundem para o núcleo das células musculares para regular a expressão de genes específicos. Por exemplo, a ativação de Smad2/3 resulta na inibição da expressão de genes envolvidos na hipertrofia e no crescimento muscular (e.g. PGC-1 α e ATF2), limitando a hipertrofia das fibras musculares e impedindo o crescimento excessivo do músculo.

Além da miostatina, outra miocina importante para o controle da plasticidade muscular é a interleucina-6 (IL-6) a qual é uma citocina inflamatória que desempenha um papel importante na regulação da plasticidade muscular, especialmente em resposta ao exercício físico. A IL-6 é liberada por várias células, incluindo células musculares, células imunológicas e tecido adiposo. Além disso, frente ao dano muscular causado pelo exercício intenso ou lesões, a IL-6 atua na resposta inflamatória aguda, recrutando células do sistema imunológico para a área afetada e promovendo a reparação e a regeneração dos tecidos danificados (Macêdo Santiago *et al.*, 2018). Além disso, ela tem a capacidade de estimular a hipertrofia muscular devido a resposta adaptativa ao treinamento de resistência, onde o exercício físico intenso leva à liberação de IL-6 e ela, juntamente com outras miocinas, sinalizam para as fibras musculares hipertrofiarem em resposta a esse estresse muscular (Ellingsgaard, Hojman e Pedersen, 2019). Apesar de seu papel na resposta inflamatória aguda, a IL-6 também pode ter um efeito anti-inflamatório de longo prazo. Ela pode ajudar a modular a resposta inflamatória crônica, contribuindo para a resolução da inflamação após o dano muscular agudo (Ellingsgaard, Hojman e

Pedersen, 2019). Em resumo, tanto a IL-6, quanto a MSTN desempenham um papéis multifacetados na regulação da plasticidade muscular. Elas estão envolvidas na resposta inflamatória, na hipertrofia muscular e na comunicação sistêmica. A participação de ambas é especialmente relevante no contexto do exercício físico e do treinamento de resistido, onde contribuem para a adaptação muscular e a melhoria do desempenho físico.

1.4 A VIA DE SINALIZAÇÃO ADRENÉRGICA NO CONTROLE DO METABOLISMO PROTEICO

O sistema nervoso simpático (SNS), um ramo do sistema nervoso autônomo (SNA), reage a situações de estresse alterando a função e o metabolismo do organismo. A ativação do SNS causa a liberação dos hormônios adrenalina (ADR) e noradrenalina (NE) produzidos pela medula da glândula adrenal, os quais agem em todo o corpo via sistema circulatório. Além da ação hormonal, a ativação do seu componente neural estimula neurônios pós-ganglionares simpáticos a secretarem o neurotransmissor NE diretamente nos vasos, glândulas e tecidos periféricos, controlando suas funções.

A maioria das ações metabólicas do SNS é exercida por meio da ativação de receptores adrenérgicos do tipo β , que são receptores de membrana acoplados à proteína G estimulatória (Gs) (Lynch GS, Ryall JG, 2008). Quando o receptor β é ativado pelas catecolaminas, ocorre a substituição da guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifostato (GTP) na subunidade alfa (α) da proteína Gs, levando a sua dissociação das subunidades beta-gama ($\beta\gamma$) (Berdeaux R, Stewart R, 2012; Lynch GS, Ryall JG, 2008). Então, a subunidade α se desloca e estimula a enzima de membrana adenilil ciclase (AC), responsável pela síntese do segundo mensageiro monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) a partir da molécula de ATP. O AMPc, por sua vez, se liga às subunidades regulatórias (R) da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) permitindo a dissociação de suas subunidades catalíticas (C α) (Berdeaux R, Stewart R, 2012; Lynch GS, Ryall JG, 2008). Uma vez dissociadas e ativas, as C α podem fosforilar diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares, incluindo os fatores de transcrição CREB (*cyclic AMP-responsive element-binding protein*) no resíduo de serina 133 (Ser¹³³), levando à estimulação da transcrição de genes-alvos que contém a região promotora o CRE (*cyclic AMP-responsive element*) (Altareos JY, Montminy

M, 2011; Ron D, Jurd R, 2005). Um destes genes-alvo de CREB é o co-ativador transcricional PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α*), considerado o principal regulador da biogênese mitocondrial (Lin J, Handschin C, Spiegelman BM, 2005). Outro gene também induzido pela sinalização adrenérgica é o NR4A3 (*Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3*) importante regulador do metabolismo oxidativo na musculatura esquelética que também é ativado por meio da contração muscular durante o exercício físico (Pearen MA et al., 2013; Kawasaki E et al., 2011; Pattamaprapanont et al., 2016).

Já está bem estabelecido na literatura que as catecolaminas exercem efeitos catabólicos no metabolismo de carboidratos e lipídeos, como a ativação da glicogenólise e lipólise, respectivamente. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que a estimulação adrenérgica pode exercer ações anti-catabólicas sobre o metabolismo de proteínas do músculo esquelético (Silveira WA et al., 2014; Graça FA et al., 2013; Navegantes LCC et al., 2000; Navegantes LCC et al., 1999). De fato, a redução das catecolaminas plasmáticas e/ou musculares induzida pela adrenalectomia (ADMX) ou simpatectomia química, respectivamente, exacerbou a hiperatividade dos sistemas proteossomal e lisossomal, acelerando-se, assim, o estabelecimento da atrofia muscular (Graça FA et al., 2013; Baviera AM et al., 2009). Por outro lado, o tratamento *in vivo* com NOR ou com clenbuterol (agonista seletivo do receptor adrenérgico do tipo β_2) foi capaz de atenuar significativamente a hiperexpressão das Ub-ligases e dos genes autofágicos em músculos atrofizados de roedores (Gonçalves DA et al., 2012; Silveira WA et al., 2020).

Apesar de grandes avanços nos últimos anos, os mecanismos moleculares envolvidos nesses efeitos ainda são pouco conhecidos. Evidências prévias sugeriram que a ação anti-catabólica das catecolaminas e dos agonistas dos receptores adrenérgicos do tipo β_2 poderia ser mediada por um mecanismo de *cross-talk* entre as sinalizações do AMPc e da insulina, resultando na ativação da via Akt/FoxO (Brennesvik EO, 2005; Kline WO et al., 2007; Gonçalves DA et al., 2009; Baviera AM et al., 2010; Graça FA et al., 2013). Em contrapartida, outras evidências *in vitro* mostraram que músculos de ratos incubados na presença de NOR ou de um ativador específico da PKA apresentaram elevados níveis de fosforilação de FoxO1, mas sem alteração no estado de fosforilação da Akt (Silveira WA et al., 2014). Mais recentemente foi demonstrado *in vivo* que a hiperexpressão músculo-específica da C α da PKA suprimiu a atividade transcricional de FoxO em músculos de camundongos

(Silveira WA et al., 2020). Ainda, a demonstração de que a atrofia muscular induzida pela inibição da PKA foi abolida pela hiperexpressão de um dominante negativo (d.n.) de FoxO (d.n.FoxO) indica que a supressão de FoxO induzida pela PKA é essencial para manter a massa muscular em condições basais (Silveira WA et al., 2020). Em conjunto, esses resultados sugerem que as catecolaminas endógenas, através da sinalização canônica AMPc/PKA, inibem os fatores de transcrição FoxO e, conseqüentemente, a atividade dos principais sistemas proteolíticos envolvidos na atrofia muscular.

É importante salientar que, embora estudos utilizando fármacos simpatomiméticos e ferramentas genéticas tenham auxiliado na compreensão dos mecanismos de ação molecular do SNS no músculo esquelético, ainda não estão claros os efeitos da ativação adrenérgica fisiológica sobre o metabolismo proteico. Desse modo, neste projeto de pesquisa serão investigados os efeitos da ativação adrenérgica induzida pelo exercício físico no metabolismo proteico muscular de roedores.

1.5 O EXERCÍCIO FÍSICO COMO MODELO FISIOLÓGICO DE HIPERATIVAÇÃO ADRENÉRGICA

Durante o exercício físico ocorre ativação do SNS com o objetivo de se realizar os ajustes cardiovasculares e hemodinâmicos necessários para satisfazer as demandas metabólicas impostas pelos músculos em atividade (Katayama K, Saito M, 2019). Existem, basicamente, duas modalidades de exercício físico: exercício aeróbio, de baixa intensidade e longa duração (baseado na resistência muscular) e exercício resistido, de alta intensidade e curta duração (baseado na força muscular) (Egan B, Zirath JR, 2013). Ambas as modalidades de exercício são capazes de causar hiperatividade simpática durante a sua realização, sendo as mudanças nos níveis plasmáticos de ADR e NOR, assim como na atividade nervosa simpática muscular (MSNA), dependentes das variáveis intensidade, volume e duração (Galbo H, 1986; Kraemer WJ, Ratamess NA, 2005; Katayama K, Saito M, 2019). Em repouso, a ADR compreende aproximadamente 80% da secreção hormonal total da glândula adrenal, enquanto a NOR por apenas 20%. Entretanto, a NOR também é produzida e secretada como neurotransmissor nos terminais nervosos dos axônios pré-sinápticos,

o que justifica sua maior concentração plasmática, em relação a ADR, durante a ativação simpática induzida pelo exercício físico (Robergs RA, Roberts SO, 2002).

Sabe-se que o exercício físico atua mantendo um estado catabólico durante sua execução e momentos após seu término, acentuando a proteólise, a qual promove a homeostase do tecido evitando o acúmulo de proteínas danificadas, favorecendo o *turnover* tecidual (Soto C, Estrada LD, 2008; Aweida D, Cohen S, 2021). Tanto estudos antigos quanto recentes demonstraram que uma única sessão de exercício físico pode atuar promovendo a melhora na contração do sarcômero e aumento da dinâmica mitocondrial (e.g. fusão e fissão mitocondrial), como também pode contribuir na modulação de íons como sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}) (Elfellah MS et al., 1989; Voltarelli VA et al., 2021). Uma única sessão também provoca uma série de adaptações fisiológicas no sistema cardiovascular como elevação da frequência cardíaca e do volume sistólico, bem como na atividade nervosa simpática, principalmente decorrente da ativação de metaborreceptores musculares que somadas coordenam as respostas adaptativas do músculo esquelético (Forjaz CLM, Tinucci T, 2000; Abreu P, Cardoso JHL, Ceccatto VM, 2017).

Tem sido constantemente apontado na literatura que o treinamento resistido é mais efetivo em aumentar a síntese de proteínas, a área de secção transversal (CSA) e a massa muscular esquelética, quando comparado ao treinamento aeróbio (Egan B, Zirath JR, 2013; Bodine SC et al., 2001a; Hornberger TA Jr, Farrar RP, 2004). Além dos efeitos anabólicos em condições basais, tem sido demonstrado que o treinamento resistido também previne a atrofia muscular em situações catabólicas (Khamoui AV et al., 2016; Kim JS et al. 2016; Padilha CS et al. 2021). Contudo, ainda que as adaptações musculares induzidas pelo treinamento físico sejam consequência da repetição do exercício, as alterações no metabolismo proteico induzidas após uma única sessão de exercício resistido não estão bem determinadas, carecendo de maiores estudos.

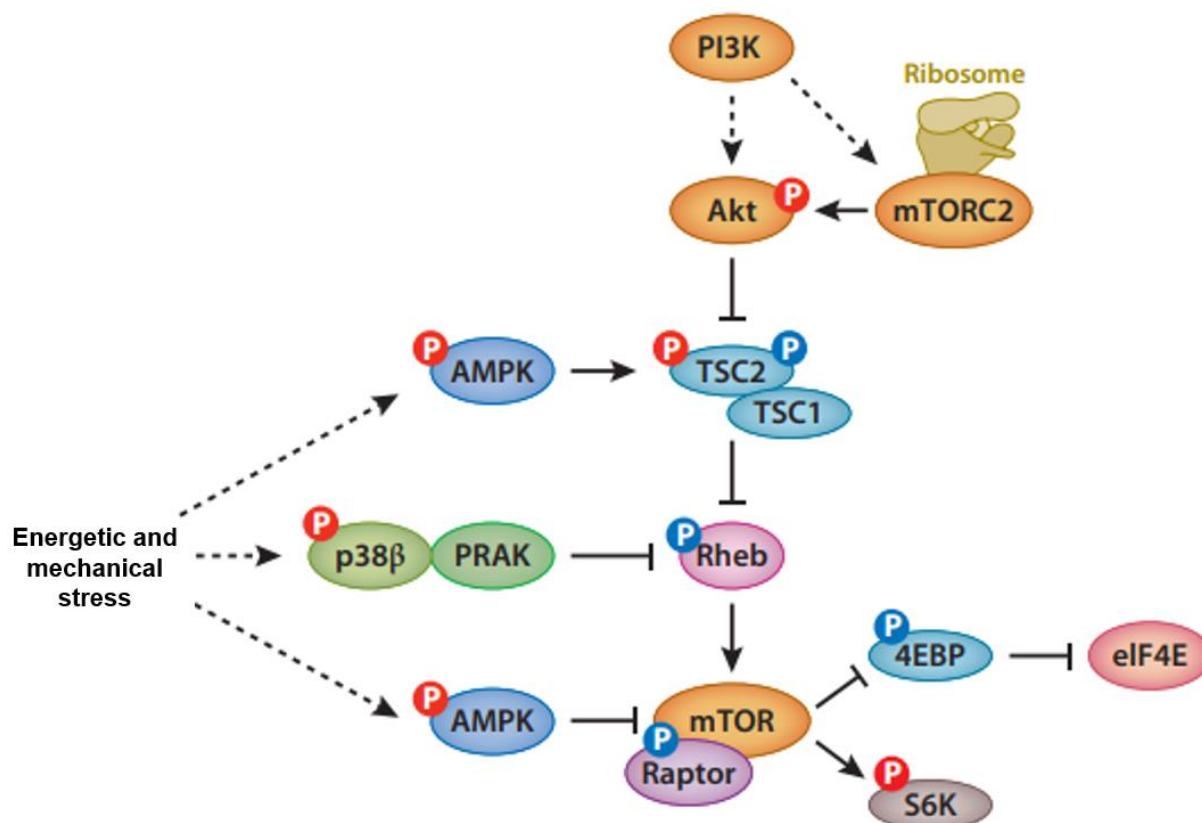
1.6 O ESTRESSE MECÂNICO AGUDO E SINALIZAÇÕES PROTEICAS ATIVADAS DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO

A sobrevivência de todos os organismos depende do controle dinâmico do metabolismo energético durante a escassez aguda ou prolongada de suprimento de nutrientes, com também durante o gasto energético no desempenho de atividades de

vida diária e exercício físico. Para tanto, é lançado mão de diversos sinais e vias metabólicas que desempenham esse controle minucioso do balanço energético nos seres vivos. Dentro das medidas para esse fim temos a atividade da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38-MAPK), ambas importantíssimas para o controle metabólico e demanda energética, principalmente durante estímulos estressante como o promovido pela contração mecânica e/ou estresse energético, ambos ocasionados pelo exercício físico (Kim J et al. 2016; Kim SH et al. 2013; Kjøbsted R et al. 2018; Kurauti MA et al. 2016; Ludlow AT et al. 2017).

Sob essa ótica, é importante compreender a interação da ativação de ambas proteínas (AMPK e p38-MAPK) durante o RE e as suas possíveis implicações tanto no controle da plasticidade muscular, quanto na interação com a sinalização adrenérgica promovida pela ativação dos receptores β_2 . Para tanto, é já de conhecimento na literatura que o estresse energético, bem como o mecânico promovem a ativação de ambas as proteínas, e que uma vez fosforiladas e ativas elas atuam principalmente regulando negativamente a via de sinalização do PI3K-mTOR, via responsável pelo estímulo de síntese proteica, promovendo um ambiente catabólico (Inoki K et al. 2012), ação importante tanto para o estímulo de renovação tecidual, como também para a disponibilização energética no momento crítico de demanda, como no exercício (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da interação de AMPK e P38-MAPK na via de sinalização PI3K/mTOR.



Fonte: adaptado de Inoki K et al. 2012.

Nota: PI3K, fosfatidilinositol-3-quinase; Akt, proteína quinase B; mTORC2, mTOR complexo 2; TSC1, complexo 1 da esclerose tuberosa; TSC2, complexo 2 da Esclerose Tuberosa; Rheb, homólogo de Ras, enriquecido no cérebro; mTOR, alvo da rapamicina em mamíferos; Raptor, proteína associada à regulação de mTOR; 4EBP, proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica; S6K, proteína ribossômica S6 quinase β 1; eIF4E, fator de iniciação de tradução eucariótica 4E; AMPK, proteína quinase ativada por AMP; p38 β , proteína quinase ativada por mitógeno p38.

1.7 PRINCIPAIS GENES ENVOLVIDOS COM A PLASTICIDADE E ADAPTAÇÃO MUSCULAR, MODULADOS PELO EXERCÍCIO E/OU PELO RECEPTOR β_2 -ADRENÉRGICO.

Amplamente abordado na literatura, principalmente após as famosas contribuições dos estudos de Rosalind Franklin e de J. Watson e F. Crick, o DNA e, portanto, a expressão dele, tornou-se alvo de diversos caminhos na pesquisa científica. Atualmente, uma das definições mais aceitas sobre o processo funcional provindo diretamente do controle gênico sobre a célula (expressão gênica) é apontado como a manifestação do gene a fim de promover a formação de um produto genético funcional, tal como proteínas e RNAs (Snustad PD, Simmons MJ, 2017).

Não divergindo dessa ótica, estudar o comportamento do material genético na fibra muscular, bem como sua contribuição durante o processo de contração e demais estímulos neste tecido, tornou-se fundamental para o avanço neste campo. Nesse contexto, diversos genes foram isolados e estudados a fim de alicerçar os mecanismos envolvidos durante estímulos como a contração, o exercício físico, estresses energéticos e hormonais. Dessa forma, a literatura vigente aponta aproximadamente 2.121 genes distintos participantes desses processos (Bizjak DA et al. 2021). Assim, dentre esses diversos genes já catalogados, o estudo daqueles que possuem maior evidência científica, como também maiores índices de publicações nos últimos 5 anos, é um cerceamento necessário a fim de concentrar esforços para corroborar com tal campo.

Por conseguinte, optamos por estudar os genes mais presentes na literatura que se relacionam da seguinte forma: 1) os genes que manifestam modulação por meio do aumento nos níveis de fosforilação de CREB (SIK1, NR4A3, NR4A1 e PGC-1 α); 2) a expressão gênica relacionada ao processo de degradação entorno dos sistemas proteolíticos UPS e autofágico-lisossomal já citados anteriormente (MuRF1, Atrogin1, LC3b e Catepsina L); 3) por fim, os genes de duas miocinas importantes para o controle da plasticidade muscular (Miostatina e IGF-1).

É comumente apontado na literatura que o estudo da interação promovida pelos diferentes mecanismos (RE e β_2 -AR) na expressão gênica é um forte indicativo dos processos biológicos sinalizados na célula (Bizjak DA et al. 2021; Nagase H et al. 2017). Dessa forma, com base na literatura já disponível é possível correlacionar de modo geral algumas das principais modulações e modificações no conteúdo celular que dependem dessas expressões gênicas aqui citadas.

Assim, é importante apontar as principais contribuições desses genes com os efeitos fisiológicos mais comumente associados à sua ativação, no que tange o músculo esquelético. Em primeiro lugar, é notável a participação de dos genes de *SKI1*, família de receptores nucleares 4A (NR4A) e PGC-1 α , que segundo Berdeaux R et al. 2007, são diretamente ou indiretamente responsáveis pela transcrição das enzimas de mesmo nome, e em consequência disso, da sua tradução e atuações biológicas a qual pode ser associada, no músculo esquelético, à: aumento de transportadores de glicose do tipo GLUT4 na membrana tecidual, manutenção de um fenótipo glicolítico, estímulo para a hipertrofia e mobilização de fonte energéticas como ácidos graxos e glicogênio (Anderson C et al. 2015; Halling JF, Pilegaard H

2020; Zhang W et al 2014). Estudos sugeriram que SIK1 pode estar envolvida na regulação da resposta ao estresse e da homeostase energética no músculo esquelético, que são processos influenciados pela sinalização adrenérgica (Takemori H et al., 2009). No entanto, o mecanismo exato pelo qual a sinalização adrenérgica afeta SIK1 no músculo esquelético ainda não está totalmente elucidado. Também nesse sentido, os genes da família NR4A desempenham um papel na regulação da diferenciação e desenvolvimento das células musculares, bem como na resposta a estímulos externos, como o exercício físico e a sinalização adrenérgica (Ordelheide *et al.*, 2013; Pearen *et al.*, 2006; Pillon *et al.*, 2020b; Wei Zhang; John Garvery W; e Nanlan Luo; W Timothy Garvery; Yuchang Fu, 2014). Contudo, a relação entre os genes NR4A e a ativação do receptor β_2 -AR no músculo esquelético não está totalmente esclarecida, mas há evidências de que os membros da família NR4A podem ser regulados por essa via.

Além desses, outros dois genes são primordiais para compreender a totalidade das ações envolvidas com os estímulos mecânicos (RE) e farmacológicos (bloqueio β_2 -AR), sendo eles promotores das seguintes miocinas: 1) gene da miostatina, que por meio do aumento da fosforilação de membros da família de SMADs os quais são inibidores direto da Akt e portanto dos efeitos na síntese proteica (hipertrofia) e anti-catabólicos (modulação de FoxO) promovidos por ela (Barbalho SM et al. 2020; Rodriguez J et al.2014). 2) gene de IGF-1, amplamente conhecido na literatura pela ativação da via de sinalização IGF-1/Akt/mTOR, canônica no controle da plasticidade muscular e estímulo de *turnover* celular (Gonçalves DA et al. 2019, Yoshida T, Delafontaine P 2020). Por fim, embora a literatura atual apresente diversas ações promovidas pela ativação gênica, ainda é necessário que estudos demonstrem de forma clara as vias de sinalização que estimulam a expressão gênica durante o exercício resistido e principalmente qual o papel da ativação simpática na modulação dessas vias e genes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do bloqueio dos β_2 -ARs nas respostas moleculares agudas induzidas por uma única sessão de RE em músculos esqueléticos de roedores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina, assim como o conteúdo muscular de noradrenalina em músculos de animais
- Os níveis séricos de corticosterona.
- Avaliar genes marcadores da ativação da sinalização adrenérgica no músculo de animais submetidos ao exercício resistido agudo.
- Avaliar o estado de síntese proteica por meio do nível de fosforilação de proteínas marcadores dessa atividade (IGF-1 e Akt),
- Avaliar a expressão de genes marcadores da hiperativação simpática muscular, tais como o PGC-1 α , SIK1, NR4a1 e NR4a3, em músculos de animais CON e RE;
- Determinar a expressão de genes marcadores de atividade dos sistemas proteolíticos Ub-proteassoma e autofágico/lisossomal , tais como Atrogin-1, MuRF1, LC3 e Catepsina L em músculos de animais CON e RE;
- Determinar a expressão gênica de miocinas tal como miostatina e IL-6;
- Verificar se o bloqueio adrenérgico sistêmico induzido pelo tratamento com antagonista seletivo dos receptores β_2 -adrenérgicos (ICI 118,551) atenua as alterações moleculares observadas em músculos de animais CON e RE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl6/J com 8 semanas de idade e pesando ~20-23g os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) com um ciclo claro-escuro de 12-12 horas (começando às 6h00) e receberam livre acesso a água e dieta normal até o início dos

experimentos. O tamanho da amostra utilizada para cada experimento está indicado nas legendas das figuras. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois (Experimento 1) ou três grupos (Experimento 2) da seguinte forma: controle (CON), exercício resistido (RE) e exercício resistido sob bloqueio de β_2 -AR (ICI + RE). Camundongos do grupo ICI +RE foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com 10 mg.kg⁻¹ do antagonista seletivo de β_2 -AR (ICI 118.551; Sigma-Aldrich) 30 min antes da luta de RE (Azevedo Voltarelli et al., 2021), enquanto os ratos dos grupos CON e RE foram injetados com veículo (solução salina a 0,9%). Os animais foram eutanasiados por decapitação (para coleta de amostras de sangue) ou deslocamento cervical (para coleta de amostras de tecidos) sob anestesia com isoflurano. Após a eutanásia, os músculos foram rapidamente coletados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até análises posteriores. Todos os experimentos e protocolos foram realizados de acordo com os princípios éticos para pesquisa animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e Comissão de Ética em Pesquisa Animal (nº 207/ 2014).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado em duas etapas. Primeiro, para testar se nosso modelo de RE agudo levaria ao aumento da atividade simpática, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: o grupo controle (CON) e o grupo de exercício resistido. Após o período de aclimação no modelo de escalada e teste de capacidade máxima de carga voluntária (MVCC), os camundongos do grupo RE foram submetidos a uma única sessão de RE (ver seção Protocolo de Exercício Resistido). Imediatamente após a sessão de exercício (0 h), os animais foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados por decapitação para a coleta de sangue e músculos a fim de realizar a coleta de catecolaminas plasmáticas e a análise de imunoblotting, respectivamente (Experimento 1). Posteriormente, para determinar a contribuição dos β_2 -ARs para a resposta transcricional do músculo esquelético após uma única sessão de RE, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: o grupo controle (CON), o grupo de exercício resistido (RE) e o exercício resistido sob bloqueio do receptor β_2 -adrenérgico (ICI + RE). Após o período de adaptação no modelo de escalada vertical e realização do teste de MVCC, os camundongos dos grupos RE e

ICI + RE foram submetidos ao protocolo RE. Por fim, três horas após a sessão de exercício, os animais foram anestesiados com isoflurano, eutanasiados por deslocamento cervical e os músculos rapidamente coletados e armazenados a -80°C até a análise por RT-qPCR (Experimento 2). Os camundongos do grupo CON permaneceram confinados em suas gaiolas durante ambos os protocolos experimentais, exceto quando todos os animais foram submetidos ao período de adaptação no modelo de escalada e ao teste MVCC.

3.3 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO RESISTIDO

O protocolo de exercício resistido foi baseado em modelos já descritos anteriormente (Frajacomo et al., 2015; Padilha et al., 2019) e consistiu em movimento de escalada em modelo de escada vertical (inclinação de 80° ; espaço de 1,0 cm entre os degraus e 56 cm de altura) utilizando sobrecarga progressiva de peso (ver Figura 1A, 1B e C). Inicialmente, foi realizado a adaptação de todas as cobaias ao modelo de escalada no decorrer de 5 dias. Para isso, os camundongos foram posicionados na base da escada e estimulados a subir para iniciar os movimentos. Estímulos de impulso foram aplicados até que cada animal conseguisse completar uma subida completa (Padilha et al., 2017). Quarenta e oito horas após a última sessão de adaptação, os animais foram submetidos ao teste MVCC, que consistiu em carregar cargas equivalentes a 50%, 75%, 90% e 100% da massa corporal fixadas na cauda de cada camundongo. Imediatamente após o animal alcançar a câmara coberta (Figura 1A), foi dado intervalo de 60s, e mantido esse padrão entre cada escalada. Após uso da carga de 100% do seu peso corporal, foi acrescentada 3g a cada nova série até que a carga incapacitasse o animal de subir todo o comprimento da escada. A carga máxima (MAX) alcançada no teste MVCC foi utilizada como parâmetro para determinar a carga da sessão de RE. Finalmente, quarenta e oito horas após o teste de MVCC, apenas os animais dos grupos RE e ICI + RE foram submetidos ao protocolo de RE agudo baseado em MAX (50%, 75%, 90%, 100%, 100% mais 3 g até a falha). A falha foi definida como a incapacidade de levantar o peso mesmo após duas tentativas sucessivas. Todos os animais permaneceram privados de alimentos desde o início dos experimentos até a eutanásia.

3.4 ANÁLISE DE CATACOLAMINAS E CORTICOSTERONA

Os músculos gastrocnêmio (GAS) e tibial anterior (TA) e as catecolaminas plasmáticas foram analisados como descrito anteriormente (Garofalo et al., 1996) usando HPLC (LC-7A, Shimadzu Instruments) com uma coluna de fase reversa Spherisorb ODS-2 de 5 μm (Sigma-Aldrich). Os níveis séricos de corticosterona foram medidos por radioimunoensaio específico conforme descrito anteriormente (Durlo et al., 2004).

3.5 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING

Os músculos gastrocnêmio (GAS) e tibial anterior (TA) foram homogeneizados em tampão RIPA contendo pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de aprotinina, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de leupeptina e Fluoreto de fenilmetil-sulfonil 1 mM (PMSF). Os lisados foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e imunotransferidos usando anticorpos listados na Tabela 1. Os anticorpos primários foram detectados usando anticorpos secundários conjugados com peroxidase e visualizados usando reagentes de quimiluminescência aprimorada (ECL) no sistema ChemiDoc XRS + (Bio -Rad). As intensidades das bandas foram quantificadas utilizando o software ImageJ/Fiji (versão 1.52 d, National Institutes of Health, EUA).

3.6 QUANTIFICAÇÃO POR Qpcr

O RNA total foi extraído de músculos gastrocnêmios individuais (GAS) usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia), depois transcrito reversamente em cDNA usando o sistema de síntese de primeira cadeia Super-Script IV (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia) de acordo com os protocolos do fabricante. A PCR quantitativa foi realizada utilizando PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo-Fisher) com primers conforme detalhado na Tabela 2 e normalizada para Rpl39.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média \pm média do erro padrão (EPM). De acordo com cada delineamento experimental, foram utilizados o teste *t* de *Student* não

pareado ou a análise de variância (ANOVA) unidirecional seguida de post hoc de Tukey nas variáveis com distribuição normal ou que apresentaram distribuição normal após a transformação logarítmica. O teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn foi utilizado para dados não paramétricos. Os dados foram analisados utilizando o software JASP 0.16.2 (licença GNU Affero GPL v3, Departamento de Métodos Psicológicos, Universidade de Amsterdã) e GraphPad Prism versão 7.0 (Graph Pad Softwares, San Diego, CA, EUA). O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

REFERÊNCIAS

- Abreu P, Leal-Cardoso JH, Ceccatto VM. Adaptação do músculo esquelético ao exercício físico: considerações moleculares e energéticas. *Rev Bras Med do Esporte* [Internet]. 2017 Feb;23(1):60–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922017000100060&lng=pt&tlng=pt
- Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Mar;12(3):141-51. doi: 10.1038/nrm3072. PMID: 21346730; PMCID: PMC4324555.
- Anderson CM, Hu J, Barnes RM, Heidt AB, Cornelissen I, Black BL. Myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle is required for normal growth and glucose metabolism in mice. *Skeletal Muscle*, 2015; 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0031-0>
- Aweida D, Cohen S. Breakdown of Filamentous Myofibrils by the UPS-Step by Step. *Biomolecules*. 2021 Jan 15;11(1):110. doi: 10.3390/biom11010110. PMID: 33467597; PMCID: PMC7830001.
- Baar K, Nader G, Bodine SC. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Eassys in Biochem*[periódico na internet]. 2006; 42:61-74[acesso em 30 mar 2021].Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17144880/>
- Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, Kelly DP, Holloszy JO. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*. 2002 Dec;16(14):1879-86. doi: 10.1096/fj.02-0367com. PMID: 12468452.
- Barbalho SM, Prado N, Alvares GR, Bechara MD, Baisi CEF, Audi M, Guissoni CLM, Landgraf GE, Buchaim RL, Buchaim D, Cressoni AA. Myokines: a descriptive review. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 2020; 60(12), 1591–1602. <https://doi.org/10.23736/S0022-4707.20.10884-3>
- Baviera AM, Zanon NM, Navegantes LC, Kettelhut IC. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Feb 5;315(1-2):104-12. doi: 10.1016/j.mce.2009.09.028. Epub 2009 Oct 3. PMID: 19804812.
- Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Oct;37(10):2098-114. doi: 10.1016/j.biocel.2005.02.029. Epub 2005 Mar 23. PMID: 16125113.
- Bell RAV, Al-Khalaf M, Megeney L A. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skeletal Muscle*. 2016 dez v. 6, n. 1, p. 16, 6. Benziane B, Burton TJ, Scanlan B, Galuska D, Canny BJ, Chibalin AV, Zierath JR, Stepto NK. Divergent cell signaling after short-term intensified endurance training in

human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Dec;295(6):E1427-38. doi: 10.1152/ajpendo.90428.2008. Epub 2008 Sep 30. PMID: 18827172.

Berdeaux R, Stewart R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Jul 1;303(1):E1-17. doi: 10.1152/ajpendo.00555.2011. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22354781; PMCID: PMC3404564.

Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD, & Montminy M. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature Medicine*, 2007; 13(5), 597–603. <https://doi.org/10.1038/nm1573>

Bizjak DA, Zügel M, Treff G, Winkert K, Jerg A, Hudemann J, Mooren FC, Krüger K, Nieß A, Steinacker JM. Effects of Training Status and Exercise Mode on Global Gene Expression in Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(22), 12578. <https://doi.org/10.3390/ijms222212578>

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001a; Nov 23;294(5547):1704-8. doi: 10.1126/science.1065874. Epub 2001 Oct 25. PMID: 11679633.

Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001b; Nov;3(11):1014-9. doi: 10.1038/ncb1101-1014. PMID: 11715023.

Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech.* 2013 Jan;6(1):25-39. doi: 10.1242/dmm.010389. PMID: 23268536; PMCID: PMC3529336.

Brennesvik EO, Ktori C, Ruzzin J, Jebens E, Shepherd PR, Jensen J. Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline. *Cell Signal.* 2005 Dec;17(12):1551-9. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.03.011. PMID: 15908181.

Bronczek GA, Soares GM, de Barros JF, Vettorazzi JF, Kurauti MA, Marconato-Junior E, Zangerolamo L, Marmentini C, Boschero AC, Costa-Junior JM. Resistance exercise training improves glucose homeostasis by enhancing insulin secretion in C57BL/6 mice. *Scientific Reports [Internet]. Springer Science and Business Media LLC*; 2021 Apr 21;11(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-88105-x>

Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Mar;77(3):1365-8. doi: 10.1073/pnas.77.3.1365. PMID: 6769112; PMCID: PMC348495.

Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):162-84. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.012. PMID: 23395166.

Elfellah MS, Dalling R, Kantola IM, Reid JL. Beta-adrenoceptors and human skeletal muscle characterisation of receptor subtype and effect of age. *Br J Clin Pharmacol.* 1989 Jan;27(1):31-8. doi: 10.1111/j.1365-2125.1989.tb05332.x. PMID: 2565118; PMCID: PMC1379702.

Forjaz CLM, Tinucci T. A medida da pressão arterial no exercício. *Revista Brasileira de Hipertensão, Ribeirão Preto*, v.7, n.1, p.79-87, 2000.

Fu Y, Luo L, Luo N, Zhu X, Garvey WT. NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance. *J Biol Chem.* 2007 Oct 26;282(43):31525-33. doi: 10.1074/jbc.M701132200. Epub 2007 Sep 4. PMID: 17785466.

Fritzen AM, Domingo-Espín J, Lundsgaard AM, Kleinert M, Israelsen I, Carl CS, Nicolaisen TS, Kjøbsted R, Jeppesen JF, Wojtaszewski JFP, Lagerstedt JO, Kiens B. ApoA-1 improves glucose tolerance by increasing glucose uptake into heart and skeletal muscle independently of AMPK α 2. *Mol Metab.* 2020 May;35:100949. doi: 10.1016/j.molmet.2020.01.013. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32244181; PMCID: PMC7082546.

Galbo H. The hormonal response to exercise. *Diabetes / Metab Rev [Internet]*. 1986 [internet];1(4):385–408 [acesso 05 mai 2021]. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/dmr.5610010404>

Gilson H, Combaret S L, Grobet L L, Attaix D, Ketelslegers J M, Thissen J P. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology.* 2007; v.148, n.1, p.452-460.

Goll DE, Netti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci.* 2008 Apr;86(14 Suppl):E19-35. doi: 10.2527/jas.2007-0395. Epub 2007 Aug 20. PMID: 17709792.

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 Dec 4;98(25):14440-5. doi: 10.1073/pnas.251541198. Epub 2001 Nov 20. PMID: 11717410; PMCID: PMC64700.

Gonçalves DA, Lira EC, Baviera AM, Cao P, Zanon NM, Arany Z, Bedard N, Tanksale P, Wing SS, Lecker SH, Kettelhut IC, Navegantes LC. Mechanisms involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Endocrinology.* 2009 Dec;150(12):5395-404. doi: 10.1210/en.2009-0428. Epub 2009 Oct 16. PMID: 19837877.

Gonçalves DA, Silveira WA, Lira EC, Graça FA, Paula-Gomes S, Zanon NM, Kettelhut IC, Navegantes LC. Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles

independently of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Jan 1;302(1):E123-33. doi: 10.1152/ajpendo.00188.2011. Epub 2011 Sep 27. PMID: 21952035.

Gonçalves DA, Silveira WA, Manfredi LH, Graça FA, Armani A, Bertaggia E, O'Neill BT, Lautherbach N, Machado J, Nogara L, Pereira MG, Arcidiacono D, Realdon S, Kahn CR, Sandri M, Kettelhut IC, Navegantes LCC. Insulin/IGF1 signalling mediates the effects of β_2 -adrenergic agonist on muscle proteostasis and growth. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2019; 10(2), 455–475. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12395>

Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol.* 2003 Feb;5(2):87-90. doi: 10.1038/ncb0203-87. PMID: 12563267.

Graça FA, Gonçalves DA, Silveira WA, Lira EC, Chaves VE, Zanon NM, Garófalo MA, Kettelhut IC, Navegantes LC. Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Dec;305(12):E1483-94. doi: 10.1152/ajpendo.00267.2013. Epub 2013 Oct 29. PMID: 24169047.

Halling JF, Pilegaard H. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2020;45(9), 927–936. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0005>

Hornberger TA Jr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol.* 2004 Feb;29(1):16-31. doi: 10.1139/h04-002. PMID: 15001801.

Horii N, Uchida M, Hasegawa N, Fujie S, Oyanagi E, Yano H, Hashimoto T, Iemitsu M. Resistance training prevents muscle fibrosis and atrophy via down-regulation of C1q-induced Wnt signaling in senescent mice. *FASEB J.* 2018 Jul;32(7):3547-3559. doi: 10.1096/fj.201700772RRR. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29401629.

Inoki K, Kim J, Guan KL. AMPK and mTOR in Cellular Energy Homeostasis and Drug Targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2012; 52(1), 381–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134537>

Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Oct;287(4):C834-43. doi: 10.1152/ajpcell.00579.2003. PMID: 15355854.

Katayama K, Saito M. Muscle sympathetic nerve activity during exercise. *J Physiol Sci [Internet]*. 2019 Jul 3;69(4):589–98. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12576-019-00669-6>

Kawasaki E, Hokari F, Sasaki M, Sakai A, Koshinaka K, Kawanaka K. The effects of β -adrenergic stimulation and exercise on NR4A3 protein expression in rat skeletal muscle. *J Physiol Sci.* 2011 Jan;61(1):1-11. doi: 10.1007/s12576-010-0114-y. Epub 2010 Oct 9. PMID: 20936441.

Kim DH, Klemp A, Salazar G, Hwang HS, Yeh M, Panton LB, Kim JS. High-dose vitamin D administration and resistance exercise training attenuate the progression of obesity and improve skeletal muscle function in obese p62-deficient mice. *Nutr Res*. 2020 Dec;84:14-24. doi: 10.1016/j.nutres.2020.10.002. Epub 2020 Oct 13.

Kim YS, Sainz RD. Beta-adrenergic agonists and hypertrophy of skeletal muscles. *Life Sci*. 1992;50(6):397-407. doi: 10.1016/0024-3205(92)90374-x. PMID: 1346465.

Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: Mechanisms of action and physiological activities. *Experimental and Molecular Medicine*, 2016; 48(4), 1–12. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.16>

Kim JS, Yoon DH, Kim HJ, Choi MJ, Song W. Resistance exercise reduced the expression of fibroblast growth factor-2 in skeletal muscle of aged mice. *Integr Med Res*. 2016 Sep;5(3):230-235. doi: 10.1016/j.imr.2016.05.001. Epub 2016 May 7. PMID: 28462123; PMCID: PMC5390455.

Kim SH, Asaka M, Higashida K, Takahashi Y, Holloszy JO, Han DH. β -Adrenergic stimulation does not activate p38 MAP kinase or induce PGC-1 α in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2013; 304(8), E844–E852. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00581.2012>

Khamoui AV, Park BS, Kim DH, Yeh MC, Oh SL, Elam ML, Jo E, Arjmandi BH, Salazar G, Grant SC, Contreras RJ, Lee WJ, Kim JS. Aerobic and resistance training dependent skeletal muscle plasticity in the colon-26 murine model of cancer cachexia. *Metabolism*. 2016 May;65(5):685-698. doi: 10.1016/j.metabol.2016.01.014. Epub 2016 Feb 4. PMID: 27085776.

Klaude M, Fredriksson K, Ader ITJ, Hammarqvist F, Ahlmans B, Rooyackers O, Wernerman J. Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis. *Clinical Science* 2007; 112: 499-506.

Kline WO, Panaro FJ, Yang H, Bodine SC. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Feb;102(2):740-7. doi: 10.1152/jappphysiol.00873.2006. Epub 2006 Oct 26. PMID: 17068216.

Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med*. 2005;35(4):339-61. doi: 10.2165/00007256-200535040-00004. PMID: 15831061.

Kjøbsted R, Hingst JR, Fentz J, Foretz M, Sanz M, Pehmøller C, Shum M, Marette A, Mounier R, Treebak JT, Wojtaszewski JFP, Viollet , Lantier L. AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *The FASEB Journal* 2018; 32(4), 1741–1777. <https://doi.org/10.1096/fj.201700442R>

Kurauti MA, Freitas-Dias R, Ferreira SM, Vettorazzi JF, Nardelli TR, Araujo HN, Santos GJ, Carneiro EM, Boschero AC, Rezende LF, Costa-Júnior JM. Acute Exercise Improves Insulin Clearance and Increases the Expression of Insulin-Degrading Enzyme in the Liver and Skeletal Muscle of Swiss Mice. *PLOS ONE* 2016; 11(7), e0160239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160239>

Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J*. 2004 Jan;18(1):39-51. doi: 10.1096/fj.03-0610com. PMID: 14718385.

Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul;17(7):1807-19. doi: 10.1681/ASN.2006010083. Epub 2006 May 31. PMID: 16738015.

Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*. 1999 Jan;129(1S Suppl):227S-237S. doi: 10.1093/jn/129.1.227S. PMID: 9915905.

Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005 Jun;1(6):361-70. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.004. PMID: 16054085.

Lynch GS, Ryall JG. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev*. 2008 Apr;88(2):729-67. doi: 10.1152/physrev.00028.2007. PMID: 18391178.

Ludlow AT, Gratião L, Ludlow LW, Spangenburg EE, Roth SM. Acute exercise activates p38 MAPK and increases the expression of telomere-protective genes in cardiac muscle. *Experimental Physiology* 2017; 102(4), 397–410. <https://doi.org/10.1113/EP086189>

Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL. Oxidative stress-induced autophagy: role in pulmonary toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014 Mar;275(2):145-151. DOI: 10.1016/j.taap.2013.12.022.

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*. 2007 Dec;6(6):458-71. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.001. PMID: 18054315.

Mathai AS, Bonen A, Benton CR, Robinson DL, Graham TE. Rapid exercise-induced changes in PGC-1alpha mRNA and protein in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2008 Oct;105(4):1098-105. doi: 10.1152/jappphysiol.00847.2007. Epub 2008 Jul 24. PMID: 18653753.

Mathur S, Brooks D, Carvalho CR. Structural alterations of skeletal muscle in copd. *Front Physiol*. 2014 Mar 19;5:104. doi: 10.3389/fphys.2014.00104. PMID: 24678302; PMCID: PMC3958732.

McArdle WD, Katch FI, Katch VL. *Fisiologia do Exercício. Energia, Nutrição e Desempenho Humano*. 7ª Edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2011.

Navegantes LCC, Resano NMZ, Migliorini RH, Kettelhut IC.

Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1999;v. 277, p. E883-E889.

Navegantes LCC, Resano NMZ, Baviera AM, 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 Sep;279(3):E663-8.

Nagase H, Yao S, Ikeda S. Acute and chronic effects of exercise on mRNA expression in the skeletal muscle of two mouse models of peripheral artery disease. *PLOS ONE*, 2007; 12(8), e0182456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182456>

Ogata T, Oishi Y, Higuchi M, Muraoka I. Fasting-related autophagic response in slow- and fast-twitch skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 26;394(1):136-40. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.130. Epub 2010 Feb 23. PMID: 20184860.

Padilha CS, Cella PS, Chimin P, Voltarelli FA, Marinello PC, de Jesus Testa MT, Guirro PB, Duarte JAR, Cecchini R, Guarnier FA, Deminice R. Resistance Training's Ability to Prevent Cancer-induced Muscle Atrophy Extends Anabolic Stimulus. *Med Sci Sports Exerc.* 2021 Feb 19. doi: 10.1249/MSS.0000000000002624. Epub ahead of print. PMID: 33731662.

Padilha CS, Marinello PC, Galvão DA, Newton RU, Borges FH, Frajacomo F, Deminice R. Evaluation of resistance training to improve muscular strength and body composition in cancer patients undergoing neoadjuvant and adjuvant therapy: a meta-analysis. *J Cancer Surviv.* 2017 Jun;11(3):339-349. doi: 10.1007/s11764-016-0592-x. Epub 2017 Jan 4. PMID: 28054255.

Padilha CS, Testa MT, Marinello PC, Cella PS, Voltarelli FA, Frajacomo FT, Cechini R, Duarte JAR, Guarnier FA, Deminice R. Resistance Exercise Counteracts Tumor Growth in Two Carcinoma Rodent Models. *Med Sci Sports Exerc.* 2019 Oct;51(10):2003-2011. doi: 10.1249/MSS.0000000000002009. PMID: 30985506.

Pearen MA, Goode JM, Fitzsimmons RL, Eriksson NA, Thomas GP, Cowin GJ, Wang SC, Tuong ZK, Muscat GE. Transgenic muscle-specific Nor-1 expression regulates multiple pathways that effect adiposity, metabolism, and endurance. *Mol Endocrinol.* 2013 Nov;27(11):1897-917. doi: 10.1210/me.2013-1205. Epub 2013 Sep 24. PMID: 24065705; PMCID: PMC5427836.

Pearen MA, Ryall JG, Maxwell MA, Ohkura N, Lynch GS, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology.* 2006 Nov;147(11):5217-27. doi: 10.1210/en.2006-0447. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16901967.

Pedersen BK. Muscle as a secretory organ. *Compr Physiol.* 2013 Jul;3(3):1337-62. doi: 10.1002/cphy.c120033. PMID: 23897689.

Rahimi N. The Ubiquitin-Proteasome System Meets Angiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2012 mar; v. 11, n. 3, p. 538–548.

Robergs, R.A.; Roberts, S.O. *Princípios Fundamentais de Fisiologia do Exercício para Aptidão, Desempenho e Saúde*. São Paulo, Phorte Ed, 2002.

Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj SA, Seiliez I, Picard B, Bonnieu A. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014; 71(22), 4361–4371. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1689-x>

Ron D, Jurd R. The "ups and downs" of signaling cascades in addiction. *Sci STKE*. 2005 Nov 8;2005(309):re14. doi: 10.1126/stke.3092005re14. PMID: 16278489.

Roubenoff R, Hughes VA. Sarcopenia: current concepts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2000 Dec;55(12):M716-24. doi: 10.1093/gerona/55.12.m716. PMID: 11129393.

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004 Apr 30;117(3):399-412. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00400-3. PMID: 15109499; PMCID: PMC3619734.

Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008 Jun;23:160-70. doi: 10.1152/physiol.00041.2007. PMID: 18556469.

Santana FM, Domiciano DS, Gonçalves MA, Machado LG, Figueiredo CP, Lopes JB, Caparbo VF, Takayama L, Menezes PR, Pereira RM. Association of Appendicular Lean Mass, and Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue With Mortality in Older Brazilians: The São Paulo Ageing & Health Study. *J Bone Miner Res*. 2019 Jul;34(7):1264-1274. doi: 10.1002/jbmr.3710. Epub 2019 May 28. PMID: 30866105.

Sartori R, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat Commun*. 2021 Jan 12;12(1):330. doi: 10.1038/s41467-020-20123-1. PMID: 33436614; PMCID: PMC7803748.

Silveira WA, Gonçalves DA, Graça FA, Andrade-Lopes AL, Bergantin LB, Zanon NM, Godinho RO, Kettelhut IC, Navegantes LC. Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. *J Appl Physiol (1985)*. 2014 Jul 1;117(1):11-9. doi: 10.1152/jappphysiol.01055.2013. Epub 2014 May 15. PMID: 24833777.

Silveira WA, Gonçalves DA, Machado J, et al. cAMP-dependent protein kinase inhibits FoxO activity and regulates skeletal muscle plasticity in mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2020 Sep;34(9):12946-12962. DOI: 10.1096/fj.201902102rr.

Soto C, Estrada LD. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol*. 2008 Feb;65(2):184-9. doi: 10.1001/archneurol.2007.56. PMID: 18268186.

Schakman O, Kalista S, Barbé C, Loumayer A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2013 Oct;45(10):2163-2172. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.05.036.

Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*. 2011 Jan 24;1(1):4. doi: 10.1186/2044-5040-1-4. PMID: 21798082; PMCID: PMC3143906.

Schnyder S, Handschin C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone*. 2015 Nov;80:115-125. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.008. PMID: 26453501; PMCID: PMC4657151.

Shen S, Liao Q, Liu J, Pan R, Lee SM, Lin L. Myricanol rescues dexamethasone-induced muscle dysfunction via a sirtuin 1-dependent mechanism. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2019 Apr;10(2):429-444. doi: 10.1002/jcsm.12393. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30793539; PMCID: PMC6463464.

Shestack R. *Fisioterapia prática*. 3.ed. Sao Paulo: Manole, 1987.

Shivachar AC, Eikenburg DC. Differential effects of epinephrine and norepinephrine on cAMP response and g(i3)alpha protein expression in cultured sympathetic neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Oct;291(1):258-64. PMID: 10490912.

Snustad PD, Simmons MJ. *Fundamentos da genética*. 2017;7th ed., Vol. 1.

Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec;36(12):2503-18. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.009. PMID: 15325588; PMCID: PMC7129593.

Tisdale MJ. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology (Bethesda)*. 2005 Oct;20:340-8. doi: 10.1152/physiol.00019.2005. PMID: 16174873.

Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J*. 2004 Jun 1;380(Pt 2):297-309. doi: 10.1042/BJ20040167. PMID: 15005655; PMCID: PMC1224192.

Voltarelli VA, Coronado M, Fernandes LG, Campos JC, Jannig PR, Ferreira JCB, Fajardo G, Brum PC, Bernstein D. β 2-Adrenergic Signaling Modulates Mitochondrial Function and Morphology in Skeletal Muscle in Response to Aerobic Exercise. *Cells*. 2021 Jan; v. 10, n. 1, p. 146. DOI 10.3390/cells10010146. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/1/146>

Yimlamai T, Dodd SL, Borst SE, Park S. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *J Appl Physiol (1985)*. 2005 Jul;99(1):71-80. doi: 10.1152/jappphysiol.00448.2004. Epub 2005 Mar 17. PMID: 15774696.

Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*. 2020 Aug 26;9(9):1970. doi: 10.3390/cells9091970. PMID: 32858949; PMCID: PMC7564605.

Yoshioka Y, Kubota Y, Samukawa Y, Yamashita Y, Ashida H. Glabridin inhibits dexamethasone-induced muscle atrophy. *Arch Biochem Biophys*. 2019 Mar 30;664:157-166. doi: 10.1016/j.abb.2019.02.006. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30771297.

Yoshida T, Delafontaine P. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*, 2020; 9(9), 1970. <https://doi.org/10.3390/cells9091970>

Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*. 2007 Dec;6(6):472-83. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.004. PMID: 18054316.

Zhang W, Garvery WJ, Nanlan L, Timothy GW, Yuchang F. MINOR (NR4A3) Overexpression in Mouse Skeletal Muscle Enhances Insulin Action. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 2014; 02(s1). <https://doi.org/10.4172/1747-0862.S1-021>

APÊNDICE A – Artigo **β_2 -ADRENOCEPTOR ACTIVATION REGULATES MUSCLE TROPHIC-RELATED GENES FOLLOWING ACUTE RESISTANCE EXERCISE IN MICE**

Ronaldo L Abdalla-Silva^{1†}, Gustavo O Zanetti⁴, Natália E S Lautherbach^{2,3}, Lilian C Heck, Dawit A Gonçalves^{4,5}, Isis C Kettelhut³, Luiz C Navegantes³, Wilian A Silveira^{1†}

¹Department of Biochemistry, Pharmacology and Physiology, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil. ²Department of Physiology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ³Department of Biochemistry/Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ⁴Exercise Physiology Laboratory, School of Physical Education, Physiotherapy and Occupational Therapy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁵Sports Training Center, School of Physical Education, Physiotherapy and Occupational Therapy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

† These authors contributed equally to this work.

Running title: β_2 -Adrenoceptor regulates genes in exercise

* **Correspondence:** Wilian A. Silveira, Department of Biochemistry, Pharmacology and Physiology, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, 38025-350, Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Tel.: 0055 (34) 3700 6847 - Email: wilian.silveira@uftm.edu.br

FUNDING INFORMATION

This work was supported by grants to Natália E S Lautherbach (FAPESP 2019/10420-3); Dawit A. Gonçalves (FAPEMIG APQ-01268-21 and APQ-02960-22); Isis C. Kettelhut (FAPESP 2018/10089-2); and Luiz C. Navegantes (PQ CNPq: 302396/2022-5; CAPES/PROEX).

E-mails: contato.ronaldoabdalla@gmail.com (R. L. Abdalla-Silva), goliveirazanetti@gmail.com (G. O. Zanetti), nutriennes@yahoo.com.br (N. Lautherbach), lilian_carmo@hotmail.com (L. C. Heck), dawit@ufmg.br (D. A. Gonçalves), navegantes@fmrp.usp.br (L. C. Navegantes), idckette@fmrp.usp.br (I. C. Kettelhut), wilian.silveira@uftm.edu.br (W. A. Silveira)

ABSTRACT

Resistance exercise (RE) training and pharmacological stimulation of β_2 -Adrenoceptors (β_2 -ARs) alone can promote muscle hypertrophy and prevent muscle atrophy. Although the activation of the sympathetic nervous system (SNS) is a well-established response during RE, the physiological contribution of the endogenous catecholamines and β_2 -ARs to the RE-induced changes on skeletal muscle protein metabolism remains unclear. This study investigated the effects of the β_2 -ARs blockade on the acute molecular responses induced by a single bout of RE in rodent skeletal muscles. Male C57BL6/J mice were subjected to a single bout of progressive RE (until exhaustion) on a vertical ladder under β_2 -AR blockade with ICI 118,551 (ICI; 10 mg.kg⁻¹, i.p.), or vehicle (sterile saline; 0.9%, i.p.), and the gene expression was analyzed in *gastrocnemius* (GAS) muscles by qPCR. We demonstrated that a single bout of RE acutely increased the circulating levels of stress-associated hormones

norepinephrine (NE) and corticosterone (CORT), as well as the muscle phosphorylation levels of AMPK, p38 MAPK and CREB, immediately after the session. The acute increase in the phosphorylation levels of CREB was followed by the up-regulation of CREB-target genes *Sik1*, *Ppargc1a* and *Nr4a3* (a central regulator of the acute RE response), 3h after the RE session. Conversely, β_2 -AR blockade fully prevented the increase in *Sik1* and significantly attenuated the *Nr4a3* mRNA levels in muscles of exercised mice. Furthermore, a single bout of RE stimulated the mRNA levels of the atrophic genes *Map1lc3b* and *Gabarapl1* (autophagy-related genes) and *Mstn* (a well-known negative regulator of muscle growth). Unexpectedly, the gene expression of *Igf-1* or *Il-6* were not affected by RE, while the atrophic genes *Murf1/Trim63* and *Atrogin-1/Mafk32* (ubiquitin-ligases) were increased only in muscles of exercised mice under β_2 -AR blockade. Interestingly, performing a single bout of RE under β_2 -AR blockade further increased the mRNA levels of *Mstn* in muscles of exercised mice. These data suggest that β_2 -ARs stimulation during acute RE stimulates the hypertrophic gene *Nr4a3* and prevents the overexpression of atrophic genes such as *Mstn*, *Murf1/Trim63*, and *Atrogin-1/Fbxo32* in the first hours of postexercise recovery, indicating that the SNS may be physiologically important to muscle adaptations in response to resistance training.

Keywords: Resistance exercise, β_2 -adrenoceptor, skeletal muscle, myostatin, NR4A3

1. INTRODUCTION

Skeletal muscle is the most abundant and plastic tissue in the human body, comprising approximately 40-50% of total body mass (Sartori, Romanello e Sandri,

2021). This tissue is fundamental for locomotion, breathing, thermogenesis, energy expenditure, and glycemic control (Pedersen, 2013; Schnyder e Handschin, 2015). In addition, muscle wasting and weakness have been associated with reduced quality of life and increased mortality in several physiopathological conditions, such as cancer, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and aging (Mathur, Brooks e Carvalho, 2014; Roubenoff e Hughes, 2000; Santana *et al.*, 2019; Tisdale, 2005). Despite these alarming findings, there is no effective pharmacological treatment for preventing muscle atrophy in such conditions.

Resistance exercise (RE) training, on the other hand, may increase muscle mass (hypertrophy) and strength (Hornberger Jr. e Farrar, 2004; Ruas *et al.*, 2012) and prevent muscle wasting in catabolic situations, such as cancer, glucocorticoids treatment, and sarcopenia (Kim *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2023; Padilha *et al.*, 2021; Testa *et al.*, 2022). These long-term adaptations to RE training involve acute and transient changes in mRNA expression of various genes in response to each single bout of exercise, including the muscle-derived myokines insulin-like growth factor 1 (IGF-1), myostatin (MSTN) and interleukin 6 (IL-6), among others (Cornish *et al.*, 2020; Piccirillo, 2019). Such changes in mRNA expression occur between 3 and 12h after an exercise bout and result in a gradual modification in protein content and activity (Egan and Zierath, 2013). Ultimately, the transcriptional and post-translational regulation induced by RE leads to muscle growth, when the rate of protein synthesis exceeds protein degradation over time (Phillips *et al.*, 1997), while reduced rates of protein degradation seem to be necessary for attenuating muscle atrophy (Graham *et al.*, 2021). Although the health benefits of regular RE training on skeletal muscle are well established, the molecular mechanism and signaling pathways controlling protein metabolism after a single bout of RE remains elusive.

Most physiological systems of the body (*i. e.* nervous, cardiovascular, respiratory, endocrine and musculoskeletal) are stimulated during RE (Athanasίου, Bogdanis e Mastorakos, 2023). For example, the RE acutely increases the secretion of catabolic hormones such as glucocorticoids (*e. g.* cortisol in humans; corticosterone in rodents) and reduces the anabolic hormone insulin (INS) (Athanasίου, Bogdanis e Mastorakos, 2023; Kraemer e Ratamess, 2005), extracellular alterations associated with decreased protein kinase B (PKB)/Akt and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ERK1/2 phosphorylation/activation in skeletal muscle (Abdullah et al., 2000; Yang et al., 2008; Hu et al., 2009). On one hand, the dephosphorylation of these intracellular mediators of the INS can activate the Forkhead box class O (*i.e.*, FoxO), leading to transcription of several components of the ubiquitin-proteasome (UPS) and autophagic-lysosomal (ALS) systems (Zhao *et al.*, 2007), which degrade most cellular proteins and organelles in skeletal muscle (Yang et al., 2008; Milan et al., 2015). Accordingly, the rate of protein degradation increases immediately after the cessation of an acute RE session, probably to prevent the accumulation of damaged proteins and organelles (Phillips et al., 1997; Grumati et al., 2011; Aweida and Cohen, 2021). On the other hand, decreased Akt and ERK1/2 phosphorylation and their downstream targets GSK-3 and mTOR activities are associated with reduced protein synthesis (Figueiredo e Markworth, 2015; Miyazaki e Takemasa, 2017; Rommel *et al.*, 2001). Despite that, enhanced myofibrillar and mitochondrial protein synthesis appear to be a critical step in the recovery of muscle homeostasis in the hours after acute RE (Wilkinson et al., 2008; Egan and Zierath, 2013). Although the molecular mechanisms involved in the increase of the protein synthesis are well characterized, the physiological role of the proteolytic systems after a single bout of RE and during adaptive muscle hypertrophy is not completely understood.

As a physiological stress, RE also stimulates the activity of the sympathetic nervous system (SNS), a branch of the autonomic nervous system (ANS), to meet the metabolic demand of active skeletal muscles during exercise (Athanasίου, Bogdanis e Mastorakos, 2023). Indeed, RE stimulates the sympathoadrenal axis to increase the plasma catecholamines levels (epinephrine [EPI] and norepinephrine [NE]) as a function of exercise intensity (Athanasίου, Bogdanis e Mastorakos, 2023; Kraemer e Ratamess, 2005), which return to the basal levels between 5 and 15 min after the end of exercise (Fatouros *et al.*, 2010; Goto *et al.*, 2008). Moreover, it has been shown that muscle sympathetic nerve activity (MSNA) also increases in proportion to the rise in intensity (Katayama e Saito, 2019). Based on that, the adrenergic actions of SNS can be mediated by a hormonal (catecholamines released from adrenal medulla) and/or a neural mechanism (NE secreted from sympathetic nerve ends) in many tissues, including skeletal muscle (Graça *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2016; Rodrigues, Anna C. Z. *et al.*, 2019a).

In skeletal muscle, there is a significant proportion of β -adrenoceptors (β -ARs), predominantly of β_2 -subtype (β_2 -AR; ~90%), that can be activated by catecholamines via circulation and/or direct muscle noradrenergic innervation (Elfellah *et al.*, 1989; Khan *et al.*, 2016; Lynch e Ryall, 2008). Upon binding of catecholamines, β_2 -ARs activate adenylyl cyclase (AC), leading to the increase in intracellular second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP), and subsequent activation of cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Lynch e Ryall, 2008). Once activated, the free catalytic subunits of PKA phosphorylate several serine (Ser) and threonine (Thr) residues on specific substrates, including the glycogen synthetase, the ryanodine receptor (RyR), and the cAMP response element-binding protein (CREB), resulting in enhanced glycogenolysis, muscle contractility, and expression of genes involved in

metabolism, respectively (Altarejos e Montminy, 2011; Berdeaux e Stewart, 2012; Cairns e Borrani, 2015; Gonçalves *et al.*, 2019). Indeed, several CREB-target genes (*e.g.*, *Nr4a3*, *Ppargc1a* and *Sik1*) are highly responsive to β_2 -AR signaling and regulates skeletal muscle metabolism, phenotype and hypertrophy (Berdeaux *et al.*, 2007; Bruno *et al.*, 2014; Pearen *et al.*, 2006). In sharp contrast, chronic treatment with β_2 -AR agonists promotes muscle protein anabolism, (Pearen *et al.*, 2009; Ryall, Sillence e Lynch, 2006). We have consistently shown that the SNS and β_2 -AR agonists not only stimulate the rate of protein synthesis (Gonçalves *et al.*, 2012; Navegantes *et al.*, 2004) but also suppress the gene expression of multiple components of the major proteolytic systems, UPS and ALS (Gonçalves *et al.*, 2019; Graça *et al.*, 2013; Joassard *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2020). Although the pharmacological effects of catecholamines and β_2 -AR on muscle protein metabolism have been extensively studied, their role as mediators of the muscle metabolic effects of RE has been scarcely investigated.

Therefore, we hypothesized that catecholamines release during RE modulates the expression of trophic genes in skeletal muscle β_2 -AR-dependent manner. The current study was undertaken to investigate the effects of the β_2 -ARs blockade on the acute molecular responses induced by a single bout of RE in rodent skeletal muscles. By using a pharmacological approach, we demonstrate that the β_2 -AR activation during acute RE is required to induce *Nr4a3* and to prevent the overexpression of atrophic genes such as *Mstn*, *Murf1/Trim63*, and *Atrogin-1/Fbxo32*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. ANIMALS AND TREATMENTS

C57Bl6/J mice (8-week-old male mice, ~20-23g) were housed in a room with a 12–12 h light–dark cycle (starting at 6:00 AM) and given free access to water and a normal lab chow diet (Nuvilab-CR1; Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) until the start of the experiments. The sample size used for each experiment is indicated in the figure legends. The animals were randomly divided into three groups as follows: control (CON), resistance exercise (RE), and resistance exercise under β 2-AR blockade (ICI + RE). Mice from ICI + RE group were treated intraperitoneally (i.p.) with 10 mg.kg⁻¹ of the selective β 2-AR antagonist (ICI 118,551; Sigma-Aldrich) 30 min before the RE bout (Azevedo Voltarelli *et al.*, 2021), whereas mice from CON and RE groups were injected with vehicle (0.9 % saline). Animals were euthanized under isoflurane anesthesia by decapitation for collecting blood and muscle samples (experiment one) or by cervical dislocation for collecting muscle samples (experiment two). After euthanasia, muscles were rapidly harvested, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C until further analyses. All experiments and protocols were performed in accordance with the ethical principles for animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo and Commission of Ethics in Animal Research (no. 207/2014).

2.2. EXPERIMENTAL DESIGN

As above mentioned, the present study was divided into two experiments. Experiment one was performed to test whether the acute RE protocol would be able to increase sympathetic activity. For that, the animals were randomly divided into two groups: 1) CON and 2) RE groups. After the familiarization period with the ladder

apparatus for RE and the maximum voluntary carrying capacity (MVCC) test, mice from the RE group were subjected to a single bout of RE (see *Resistance Exercise Protocol* section). Immediately after the exercise session (0 h), the animals were anesthetized with isoflurane and euthanized by decapitation for collecting blood and muscle samples in order to analyze plasma catecholamines by HPLC and muscle proteins content and phosphorylation by immunoblotting. Experiment two was performed to determine the contribution of β_2 -ARs to skeletal muscular transcriptional response following a single bout of RE. For that, the animals were randomly divided into three groups: 1) CON, 2) RE, and 3) RE under the β_2 -AR blockade group (ICI + RE). After the familiarization period with the ladder apparatus for RE and MVCC test, mice from RE and ICI + RE groups were submitted to the RE protocol. Three hours (3h) after the exercise session, the animals were anesthetized with isoflurane, euthanized by cervical dislocation, and muscles were rapidly harvested and stored at -80°C until qPCR analysis. The 3h period was chosen because studies performed in rodents subjected to a single bout of exercise demonstrated transient changes in mRNA levels in the first hours of recovery, typically between 3 and 12 h after exercise cessation (Egan and Zierath, 2013; Egan and Sharples, 2023). Mice from the CON group remained confined in their cages during both experimental protocols, except when all animals were submitted to the familiarization period with the ladder apparatus for RE and MVCC test.

2.3. RESISTANCE EXERCISE PROTOCOL

The resistance exercise (RE) protocol was based on previous reports (Frajacomo *et al.*, 2015; Padilha *et al.*, 2019) and consisted of ladder climbing (80°

incline; 1.0 cm space between steps, and 56 cm height) using progressive overload (see Figure 1A, 1B and C). Initially, all mice were familiarized to voluntary climbing the ladder over five consecutive days. For this, mice were positioned on the base of the ladder and stimulated to climb by pushing them to initiate movements. Push stimuli were applied until each animal was able to complete an entire climb (Padilha *et al.*, 2017). Forty-eight hours after the last familiarization session, the animals were submitted to MVCC test, which consisted of carrying loads equivalent to 50%, 75%, 90%, and 100% of body mass attached to the tail of each mouse. When the animal reached the covered chamber (Figure 1A), an interval of 60 s was given between each climbing bout. After climbing the ladder with 100% of its body mass, a 3 g load was added for the next climbs until a load that incapacitated the animal to climb the complete ladder length. The maximum load (MAX) achieved in the MVCC test was used as a parameter to determine the carrying load during the acute RE session. Finally, forty-eight hours after MVCC test, only the animals from RE and ICI + RE groups were submitted to MAX-based protocol of acute RE (50% of MAX, 75%, 90%, 100%, 100% plus 3 g until failure). Failure was defined as the inability to lift the weight even after two successive attempts. All animals remained food deprived from the start of the experiments until euthanasia (about 3.5 hours).

2.4. CATECHOLAMINES AND CORTICOSTERONE LEVELS

Both catecholamines, epinephrine (EPI) and norepinephrine (NE) from *gastrocnemius* (GAS) and *tibialis anterior* (TA) muscles and plasma were assayed as previously described (Garofalo *et al.*, 1996) using HPLC (LC-7A, Shimadzu Instruments) with a 5- μ m Spherisorb ODS-2 reversed-phase column (Sigma-Aldrich).

Serum corticosterone levels were measured by specific radioimmunoassay as previously described (Durlo *et al.*, 2004).

2.5. WESTERN BLOTTING ANALYSIS

GAS and TA muscles were homogenized in RIPA buffer containing 10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium orthovanadate, 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of aprotinin, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of leupeptin, and 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF). Lysates were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotted using antibodies listed in Table 1. Primary antibodies were detected using peroxidase-conjugated secondary antibodies and visualized using enhanced chemiluminescence (ECL) reagents on ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad). Band intensities were quantified using the software ImageJ/Fiji (version 1.52 d, National Institutes of Health, USA).

2.6. REAL-TIME qPCR

The analysis of qPCR was performed at the Laboratory of Metabolism Control from Ribeirão Preto Medical School (University of São Paulo). After the exercise protocol described above, GAS muscles were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Total RNA was extracted from muscle using TRIzol (50 mg of muscle was added to 0,5 ml of TRIzol, Invitrogen®). Samples were homogenized in tubes using a TissueLyser II (Qiagen®) with 5 mm stainless steel beads for 2×1 min cycles at 30 Hz, resting on ice in between. Homogenates were cleared by centrifugation at $10,000 \times g$ for 5 min at 4°C . RNA extraction was performed according to TRIzol

manufacturer's instructions (Invitrogen®). RNA was eluted in 50 µl of RNase-free water and stored at – 80 °C. RNA samples were treated with DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific®), to remove genomic DNA contamination. RNA samples were quantitated using NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific®), following the manufacturer's instructions. The same device was used to assess the purity of RNA by measuring 260/280 and 260/230 ratios of absorbance values. Samples presenting a 260/280 ratio of ~2 and 260/230 ratio of 2 to 2.2 were accepted as "pure" for RNA. According to the manufactures' protocols, one microgram of RNA was reverse transcribed into cDNA using 0,5 µL of SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen®). cDNA was diluted 25-fold with nuclease-free water. For qPCR, the total volume per reaction was 10 µL containing 5 µL of cDNA (2 ng/µL), 4.8 µL of PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher®), and 0.2 µL of primers (forward and reverse mixture; 50 µmol/L stock; Table 2). qPCR run on Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System, using the recommended cycling conditions as follows: a pre-incubation of 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, followed by a two-step amplification program of 40 cycles set at 95 °C for 15 s (denaturation) and 60 °C for 1 min (annealing + extension) and, finally, a dissociation stage set at 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 95 °C for 15 s. The last stage was performed to evaluate the quality of qPCR reactions regarding of nonspecific amplification and primer-dimer formation in a dissociation curve for each gene. The amplification specificity for each primer was confirmed by observing the single melt curve peak after the completion of qPCR. Primer sequences were designed utilizing Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/>) in conjunction with OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/site>) and cross-referenced using the Basic Local Alignment Search Tool program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A six-point relative

standard curve was prepared for each gene by using five-fold serial dilutions of pooled cDNA samples in duplicate. No threshold cycle quantification value for the no template control was detected. The relative expression levels of target genes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Schmittgen e Livak, 2008). Data from the target genes were normalized by the expression of *Rpl39* as a reference gene.

2.7. STATISTICS

The distribution and variance homogeneity were tested using Shapiro-Wilk test. The data are expressed as means \pm standard error mean (SEM). According to each experimental design, non-paired Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc were used in normally distributed variables or those that showed a normal distribution after log transformation. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post hoc test was used for non-parametric data. Data were analyzed using JASP 0.16.2 software (GNU Affero GPL v3 license, Department of Psychological Methods, University of Amsterdam) and GraphPad Prism version 7.0 (Graph Pad Softwares, San Diego, CA, USA). The significance level adopted was 5% ($p \leq 0.05$).

3. RESULTS

3.1. *A single bout of RE acutely increases the circulating levels of norepinephrine and corticosterone*

Since it has been demonstrated that RE may stimulate a stress response by activating both the sympathetic-adrenomedullary and the hypothalamus-pituitary-

adrenal (HPA) axis (Athanasίου, Bogdanis e Mastorakos, 2023; Kraemer e Ratamess, 2005), we first investigated the acute effect of the ladder climbing-based RE protocol on circulating catecholamines and corticosterone levels. As expected, a single bout of RE acutely increased the serum corticosterone (~3-fold) and plasma NE (~2-fold) levels (Figures 2A and B). On the other hand, plasma EPI levels were not altered (Figure 2A). Moreover, because muscle sympathetic nerve activity (MSNA) has also been reported to increase during exercise (Katayama e Saito, 2019), we evaluated the NE levels in GAS and TA muscles of mice immediately after the RE session. As shown in Figure 2C, the NE levels in both muscles were unchanged following RE.

3.2. A single bout of RE acutely stimulates intracellular pathways involved in energy metabolism and adrenergic signaling in skeletal muscle

Because RE stimulated systemic SNS activity, we examined whether the canonical β -AR signaling pathway, *i.e.*, PKA/CREB signaling, was also activated in the muscles of exercised mice. Although TA muscles were unaffected, a single bout of RE acutely increased the phosphorylation levels of CREB (~30%) in GAS muscles, without altering the phosphorylation levels of other PKA substrates at Ser/Thr (Figures 3A, 3B, and 3C). These findings suggest that the activity of transcription factor CREB was increased, but other upstream kinases than PKA may have also been responsible for such an effect. In addition to PKA, the protein kinases AMPK, CaMKII, and p38 MAPK (via mitogen- and stress-activated kinase 1; MSK1), may induce CREB phosphorylation at Ser¹³³ (Bengal, Aviram e Hayek, 2020; Shaywitz e Greenberg, 1999). Indeed, we observed a substantial increase in the phosphorylation levels of p38 MAPK (2-fold) and AMPK (2-fold), but not in CaMKII, in GAS muscles (Figure 4A-4D). Together, these

data indicate that a single bout of RE acutely stimulates plasma NE and CREB phosphorylation in muscles, probably via activation of the p38 MAPK and/or AMPK pathways (Thomson et al., 2008).

3.4. β_2 -adrenoceptor blockade attenuates the RE-induced increase in CREB-target genes

Because most of the metabolic actions of catecholamines in skeletal muscle are exerted through β_2 -AR (Berdeaux e Stewart, 2012), we hypothesize that the acute increase in plasma NE levels induced by RE would lead to enhanced muscle transcriptional activity of CREB through a β_2 -AR-dependent mechanism. To test this hypothesis, we first subjected mice to the maximum voluntary carrying capacity (MVCC) test under β_2 -AR blockade with the selective β_2 -AR antagonist ICI 118,551 (ICI; 10 mg.kg⁻¹, i.p., 30 min prior RE session), in order to evaluate whether ICI pre-treatment would affect mice performance. As shown in Table 3, the mean values of the ICI+RE group were very similar to saline treated-group (41,7±1,1 and 42,8±0,7g, for maximal carrying load; 9,0±1,2 and 10,0±0,7 for number of climbs until exhaustion; 290,69±23,7, and 326,8±24,3g for training volume; and 16,0±0,9 14,5±1,2min for duration of RE session). Thereafter, we measured the mRNA expression of CREB-target genes (*i.e.*, *Sik1*, *Nr4a3*, *Nr4a1* and *Ppargc1a*) 3h after the exercise session. As shown in Figure 6, *Sik1* (~3-fold), *Nr4a3* (~6-fold) and *Ppargc1a* (*Pgc-1 α* ; ~3.5-fold) mRNA levels were upregulated after acute RE in GAS muscles. Performing RE under β_2 -AR blockage (ICI+RE) prevented the increase in *Sik1* mRNA expression (Figure 6A) and attenuated *Nr4a3* expression (~50%; Figure 6B) when compared with RE. On the other hand, ICI+RE did not alter the mRNA expression of *Ppargc1a* induced by RE

(Figure 6D). Thus, our data suggest that acute RE requires the activation of β_2 -AR to upregulate the muscle expression of specific CREB-target genes and raise the possibility that at least part of this effect might be directly mediated by plasma NOR.

3.5. β_2 -AR blockade exacerbates the expression of atrophic genes after an acute RE

Because we have shown that catecholamines and β_2 -AR agonists induce anti-catabolic effects on skeletal muscle protein metabolism (Gonçalves *et al.*, 2019; Graça *et al.*, 2013) we next investigated the role of β_2 -AR activation in the expression of myokines and UPS- and ALS-related genes after a single bout of RE. As shown in Figure 7A, the mRNA expression of the negative regulator of muscle mass myostatin (*Mstn*; ~70%), but not the growth factor *igf-1* or the cytokine *Il-6*, was increased by a single bout of RE in GAS muscles. Moreover, acute RE only slightly increased the mRNA expression of *map1lc3b* (~30%) and *Gabarapl1* (~50%), an effect that was not observed in *Ctsl* and *Bnip3* (Figures 7B and 7C). In contrast, the β_2 -AR blockade in ICI+RE enhanced the expression of *MuRF1/Trim63*, (~ 3.5-fold), *Atrogin-1/Fbxo32* (~50%), and *Bnip3* (~40%) (Figures 7B and 7C). Importantly, the RE-induced increase in *Mstn* mRNA expression was further upregulated (~ 40%) in GAS muscles of exercised mice pretreated with ICI (Figure 7A). Taken together, these data indicate that the β_2 -AR activation restrains the overexpression of atrophy-related genes after a single bout of RE.

DISCUSSION

The present study provides molecular evidence that β_2 -AR activation during a single bout of RE acutely upregulates the *Nr4a3* gene, a central regulator of the acute RE response, and prevents the overexpression of atrophic genes such as *Mstn*, *Murf1/Trim63*, *Atrogin-1/Fbxo32*, and *Bnip3* in mice skeletal muscle. These data provide further evidence that the SNS may be physiologically important to muscle adaptations in response to resistance training. Here, we demonstrated that mice performing a single bout of a ladder climbing-based RE protocol showed a marked increase in plasma NE levels, without significant change in plasma EPI. The increase in plasma catecholamines was expected, because exercise is considered a stressful stimulus that stimulates the sympathoadrenal system to meet the physiological demand of active skeletal muscles (Athanasίου, Bogdanis e Mastorakos, 2023). Although both plasma NE and EPI levels continuously increase as a function of RE intensity (Kraemer e Ratamess, 2005), the plasma NE response is greater when compared to EPI (Greife *et al.*, 1999). Similar to plasma catecholamines, muscle sympathetic nerve activity (MSNA) gradually increases in proportion to the rise in exercise intensity (Katayama e Saito, 2019). More important, we and others have recently demonstrated that the SNS directly innervates neuromuscular junctions and regulates skeletal muscle metabolism, fiber type composition, and cross-sectional area (Khan *et al.*, 2016; Rodrigues, Anna C. Z. *et al.*, 2019b). In the present study, however, the increase in muscle content of NE was not observed after the RE bout, most likely due to NE diffusion from synapses (mainly from active muscles) into the plasma (Rowell e O'Leary, 1990). Indeed, plasma NE concentration is greatly influenced by the rate of NE diffusion. Therefore, it cannot be excluded that an increase of NE release directly into muscle may have occurred during the RE bout. The measurement of muscle NE turnover (Graça *et al.*, 2013) and muscle sympathetic denervation (Silveira

et al., 2014) would be necessary to determine the direct contribution of muscle sympathetic activity to the molecular changes induced by acute RE.

Independently of the systemic or local origin of NE, we have pieces of evidence that SNS stimulates muscle cells in response to RE. The present finding in GAS muscle that a single bout of RE increased the phosphorylation levels of CREB, a well-established target of PKA, and its specific target genes (i.e. *Sik1*, *Nr4a3*, and *Ppargc1a*), suggests that the canonic β_2 -AR/PKA/CREB signaling pathway were stimulated. Consistently, the β_2 -AR blockage completely abolished or attenuated the upregulation of *Sik1* and *Nr4a3* gene expression, respectively, in GAS muscles from exercised mice. Similar findings were reported by Bruno *et al.* (Bruno *et al.*, 2014) showing that the expression of *Sik1* mRNA was markedly induced by a high-intensity exercise, and this response was prevented by the pre-treatment with propranolol, a pan β -AR antagonist (Bruno *et al.*, 2014; Goode *et al.*, 2016). However, a few studies have investigated the role of the kinase SIK-1 on skeletal muscle physiology. Berdeaux *et al.* (Berdeaux *et al.*, 2007) proposed that, under adrenergic stimulation with the β -adrenergic agonist isoproterenol, CREB activates the myogenic program by increasing the amount of SIK-1 in C2C12 cells and adult skeletal muscles. When activated (dephosphorylated form), SIK-1 phosphorylates class II histone deacetylases (HDACs) and indirectly promotes the expression of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) target genes (Berdeaux *et al.*, 2007). Accordantly, the overexpression of SIK1 in muscle cells induces nuclear export of HDAC5 and increases MEF-2C transcriptional activity in vitro (Takemori *et al.*, 2009b). Despite these data, there is no evidence that SIK-1 regulates muscle protein metabolism in response to exercise.

In contrast to our data, Goode *et al.* (Goode *et al.*, 2016) suggested that the increase in *Nr4a3* mRNA after endurance exercise is independent on β -AR signaling,

since its expression was not attenuated by the treatment with the β -AR antagonist propranolol. These conflicting results may be due to differences in the experimental approaches, including pharmacological treatment (selective versus non-selective β_2 -AR antagonist) and type of exercise bout (endurance exercise versus RE). Despite that, recent evidences have shown that the *Nr4a3* gene was robustly induced by a novel RE model in mice (Cui *et al.*, 2020) and by acute RE in human skeletal muscle (Nader *et al.*, 2014). Indeed, using gene ontology and pathway analyses to reveal pathways activated by inactivity, aerobic versus resistance, and acute versus chronic exercise training, Pillon (Pillon *et al.*, 2020a) identified *Nr4a3* as one of the most exercise- and inactivity-responsive genes, and establish its role in regulating mitochondrial function and mediating glucose uptake in response to electrical pulse stimulation in primary human myotubes in vitro. Additionally, it has been shown that transgenic overexpression of NR4A3 promotes skeletal muscle hypertrophy, oxidative phenotype, and vascularization in mice (Goode *et al.*, 2016). Although it has already been shown that acute exercise (Cui *et al.*, 2020; Goode *et al.*, 2016) and β_2 -AR stimulation (Berdeaux *et al.*, 2007; Pearen *et al.*, 2009) alone may induce the expression of *Sik1* and *Nr4a3* mRNA, to our knowledge, this is the first study to demonstrate that the RE-induced upregulation of both genes is completely or partially dependent on β_2 -AR activation, respectively. Further experiments are needed to define the specific role of *Nr4a3* and *Sik-1* expression in mediating the effects of β_2 -AR stimulation on muscle protein metabolism in response to RE.

The reason for differences between TA and GAS muscles in response to acute RE cannot be accounted for in the present study, but exercised muscles are either under the influence of extrinsic (e.g. neural and hormonal) and intrinsic (e.g. mechanical and metabolic) factors that activate/repress several intracellular signaling

pathways (Egan and Zierath, 2013). For example, the finding that *Sik1* and *Nr4a3* gene expression were induced in a β_2 -AR-dependent manner reinforces the hypothesis that acute RE increased the sympathetic activity in GAS muscle, probably by a metaboreflex-induced mechanism (Fisher, Young e Fadel, 2015), since GAS muscle, but not TA, is highly recruited during climbing movements (Lourenço *et al.*, 2020). On the other hand, the fact that the expression of *Ppargc1a* mRNA induced by RE was not affected by β_2 -AR blockage raise the possibility that the expression of this transcription co-activator is under control of intrinsic signals, such as increased intracellular calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$, AMP:ATP ratio and mechanical tension, among others (Egan and Zierath, 2013). Accordingly, these signals may trigger the activation of protein kinases involved in several metabolic processes including AMPK, CaMKII, and p38 MAPK. In agreement with this notion, we demonstrated that the phosphorylation levels of AMPK and p38 MAPK, but not CaMKII, increased in GAS muscle immediately after acute RE. It is important to mention that these kinases seem to be activated by an intensity-dependent manner and may stimulate *Ppargc1a* gene transcription by different regulators, such as activating transcription factor2 (ATF2), myocyte enhancer factor 2 (MEF2), CREB, and HDACs (Wojtaszewski *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2006; Akimoto *et al.*, 2008; Egan and Zierath, 2013). Indeed, it has been shown that p38 MAPK can phosphorylate and activate the ATF2 transcription factor, whereas AMPK can directly phosphorylate CREB during exercise, upregulating *Ppargc1a* mRNA (Akimoto *et al.*, 2008; Thomson *et al.*, 2008). Taken together, these data suggest that acute RE may upregulate *Ppargc1a* expression by multiple muscle intrinsic signals in a β_2 -AR-independent manner.

As previously reported (Manfredi *et al.*, 2017; Silvestre *et al.*, 2017), our ladder climbing-based progressive RE increased serum corticosterone (CORT) levels

immediately after the end of the exercise session, and probably reduced insulin (INS) secretion in exercised mice (Kraemer e Ratamess, 2005; Raastad, Bjørro e Hallén, 2000). During catabolic conditions, such as fasting and type 1 diabetes mellitus, the low levels of circulating insulin and high levels of glucocorticoids drive the activation of muscle protein degradation by UPS and ALS to support liver gluconeogenesis and the energy requirements of the organism (Hu et al., 2009; Graça et al., 2013). In fact, Hu et al., (Hu et al., 2009) have demonstrated that both impaired INS signaling and increased endogenous glucocorticoids are required to stimulate muscle protein degradation by UPS. Thus, reduced activity of the INS/Akt signaling leads to a marked increase in atrophic genes and muscle atrophy via the transcriptional activity of FoxO members (e.g., FoxO1 and FoxO3a) (Schiaffino e Mammucari, 2011). Due to the catabolic nature of the acute exercise, it has been shown that the rate of overall protein degradation and the induction of these atrophic genes also increases in human skeletal muscle immediately after the acute RE, likely to prevent the accumulation of damaged proteins and organelles (Phillips et al., 1997; Louis et al., 2007). However, the effect of a progressive RE bout on acute molecular changes in rodent skeletal muscle is poorly understood. The present study shows that, immediately after the exercise session, a single bout of RE performed until exhaustion did not affect the phosphorylation/activation status of the major signaling pathways stimulated by INS and IGF1 controlling muscle protein synthesis (i.e., Akt, ERK1/2, and their downstream targets GSK-3 and mTOR), and protein degradation (i.e., FoxO). These data are controversial because published data have not been consistent on whether these signaling are increased or unaffected in response to acute RE (Bolster *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2010; Kido *et al.*, 2016; McIntosh *et al.*, 2023). Again, these conflicting results may be due to differences in the experimental approaches, including exercise

protocol, species (rodents versus humans), and time point of sample collecting after the session bout, among others.

It is well known that the SNS also contributes to the establishment of a catabolic state during acute exercise since catecholamines stimulates the catabolism of glycogen and intramuscular triglyceride through β_2 -AR/cAMP/PKA signaling in skeletal muscle (Egan and Zierath, 2013; Bruno et al., 2014). Conversely, we and others have consistently shown that both catecholamines and β_2 -AR agonists exert anticatabolic actions on protein metabolism and contribute to the maintenance of skeletal muscle mass under basal and catabolic conditions (Navegantes et al., 1999; Baviera et al., 2008; Graça et al., 2013; Khan et al., 2016; Gonçalves et al., 2019; Rodrigues et al., 2019). Thus, we hypothesized that the activation of β_2 -ARs during acute RE could prevent the expression of atrophic genes in the skeletal muscle of exercise mice. Accordingly, we demonstrate that performing acute RE under β_2 -AR blockade upregulates the expression of the Ub-ligases *Murf1/Trim63* and *Atrogin-1/Fbxo32*. Although the exact molecular mechanisms cannot be accounted for in the present study, treatment with β_2 -agonists has been suggested to inhibit atrophic gene expression by stimulating Akt/FoxO signaling pathway (Gonçalves et al., 2019). Our findings are in partial agreement with other studies showing that chemical (Baviera et al., 2008) or surgical (Graça et al., 2013) sympathectomy exacerbates atrophic genes during type I diabetes and fasting, respectively, apparently by a further decrease in Akt stimulation. An alternative possibility to the suppressive action of SNS in atrophic genes during RE is that cAMP/PKA signaling could mediate such an effect. In agreement with this notion, we have recently shown that muscle-specific overexpression of PKI (PKA inhibitor peptide) decreased the phosphorylation levels of CREB and up-regulated the transcriptional activity of FoxO and the mRNA expression

of *Atrogin-1* and *MuRF1*, resulting in myofiber atrophy (Silveira *et al.*, 2020). More important, the muscle-specific activating of PKA by the overexpression of PKA catalytic subunit suppressed FoxO transcriptional activity by multiple mechanisms in vivo, in addition to FoxO phosphorylation, acetylation, and nuclear export (Silveira *et al.*, 2020), raising the possibility that this cAMP/PKA signaling may have mediate this anti-catabolic action. Further studies are required to confirm this hypothesis.

An interesting finding of this study was that performing acute RE under β_2 -AR blockade amplified the expression of *Mstn* mRNA in exercised muscles, suggesting that the β_2 -AR signaling restrains *Mstn* overexpression during RE. Since it has been shown that the expression of a constitutively active form of FoxO1 may upregulate *Mstn* mRNA in differentiated C2C12 myotubes (Allen e Unterman, 2007), it is reasonable to speculate that prevention of the activation of PKA/CREB signaling by ICI in the muscles of exercised mice could exacerbate FoxO activity and consequently *Mstn* expression. Additionally, it is also possible that abrogation of RE-induced *N4a3* expression by β_2 -AR blockade could further upregulate *Mstn* mRNA. This hypothesis is based on findings that reduced endogenous *Nr4a3* mRNA levels induced by stable expression of a NOR-1 (*i. e.*, NR4A3) small interfering RNA in C2C12 cells led to a dramatic upregulation of *Mstn* mRNA expression, whereas *NR4a3* overexpression induced by an expression vector (pSG5-NOR-1) repressed *Mstn* promoter activity and gene expression (Goode *et al.*, 2016; Pearen *et al.*, 2009). Although these findings suggest that β_2 -AR/PKA/CREB signaling may contribute to the adaptive anabolic pathways in response to RE, further experiments are needed to confirm all these hypotheses.

In summary, the present data suggest that β_2 -AR stimulation during acute RE upregulates the expression of the hypertrophic gene *Nr4a3* and restrains the atrophic

genes *Mstn*, *Murf1/Trim63*, *Atrogin-1/Fbxo32* and *Bnip3* in skeletal muscle. These effects may be physiologically important for preventing excessive protein breakdown during muscle contractions and for establishing the anabolic state observed during recovery from acute RE, which may contribute, at least in part, to the muscle adaptations in response to regular RE training.

REFERENCE

ABDULLAH, O. A. . *et al.* Regulation of MAP kinase pathway activity in vivo in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 278, n. 6, p. E992–E999, 1 jun. 2000.

AKIMOTO, T.; LI, P.; YAN, Z. Functional interaction of regulatory factors with the *Pgc-1* α promoter in response to exercise by in vivo imaging. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 1, p. C288–C292, jul. 2008.

ALLEN, D. L.; UNTERMAN, T. G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C188–C199, jan. 2007.

ALTAREJOS, J. Y.; MONTMINY, M. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 3, p. 141–151, 23 mar. 2011.

ATHANASIOU, N.; BOGDANIS, G. C.; MASTORAKOS, G. Endocrine responses of the stress system to different types of exercise. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 24, n. 2, p. 251–266, 15 abr. 2023.

AWEIDA, D.; COHEN, S. Breakdown of Filamentous Myofibrils by the UPS–Step by Step. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 110, 15 jan. 2021.

AZEVEDO VOLTARELLI, V. *et al.* β 2-Adrenergic Signaling Modulates Mitochondrial Function and Morphology in Skeletal Muscle in Response to Aerobic Exercise. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 146, 13 jan. 2021.

BARBALHO, S. M. *et al.* Myokines: a descriptive review. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 60, n. 12, p. 1591–1602, 1 nov. 2020.

BAVIERA, A. M. *et al.* Chemical sympathectomy further increases muscle protein degradation of acutely diabetic rats. **Muscle & Nerve**, v. 38, n. 2, p. 1027–1035, ago. 2008.

BENGAL, E.; AVIRAM, S.; HAYEK, T. p38 MAPK in Glucose Metabolism of Skeletal Muscle: Beneficial or Harmful? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 18, p. 6480, 4 set. 2020.

BERDEAUX, R. *et al.* SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. **Nature Medicine**, v. 13, n. 5, p. 597–603, 29 maio 2007.

BERDEAUX, R.; STEWART, R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 1, p. E1–E17, 1 jul. 2012.

BOLSTER, D. R. *et al.* Immediate Response of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Mediated Signalling Following Acute Resistance Exercise in Rat Skeletal Muscle. **The Journal of Physiology**, v. 553, n. 1, p. 213–220, nov. 2003.

BOYER, J. G. *et al.* ERK1/2 signaling induces skeletal muscle slow fiber-type switching and reduces muscular dystrophy disease severity. **JCI Insight**, v. 4, n. 10, 16 maio 2019.

BRUNO, N. E. *et al.* Creb coactivators direct anabolic responses and enhance performance of skeletal muscle. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 9, p. 1027–1043, 2 maio 2014.

CAIRNS, S. P.; BORRANI, F. β -Adrenergic modulation of skeletal muscle contraction: key role of excitation-contraction coupling. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 21, p. 4713–4727, 1 nov. 2015.

CORNISH, S. M. *et al.* A focused review of myokines as a potential contributor to muscle hypertrophy from resistance-based exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 120, n. 5, p. 941–959, 6 maio 2020.

CUI, D. *et al.* A novel voluntary weightlifting model in mice promotes muscle adaptation and insulin sensitivity with simultaneous enhancement of autophagy and mTOR pathway. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 6, p. 7330–7344, 18 jun. 2020.

DURLO, F. V. *et al.* Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. **Experimental Physiology**, v. 89, n. 5, p. 541–548, set. 2004.

EGAN, B.; SHARPLES, A. P. Molecular responses to acute exercise and their relevance for adaptations in skeletal muscle to exercise training. **Physiological Reviews**, v. 103, n. 3, p. 2057–2170, 1 jul. 2023.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, fev. 2013a.

____. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 5 fev. 2013b.

ELFELLAH, M. *et al.* Beta-adrenoceptors and human skeletal muscle characterisation of receptor subtype and effect of age. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 31–38, jan. 1989.

ELLINGSGAARD, H.; HOJMAN, P.; PEDERSEN, B. K. Exercise and health — emerging roles of IL-6. **Current Opinion in Physiology**, v. 10, p. 49–54, ago. 2019.

ESPOSITO, P. *et al.* Myostatin: Basic biology to clinical application. *Em*: [s.l.: s.n.]. p. 181–234.

FATOUROS, I. *et al.* Acute resistance exercise results in catecholaminergic rather than hypothalamic–pituitary–adrenal axis stimulation during exercise in young men. **Stress**, v. 13, n. 6, p. 461–468, 28 nov. 2010.

FIGUEIREDO, V. C.; MARKWORTH, J. F. Mechanisms of protein synthesis activation following exercise: new pieces to the increasingly complex puzzle. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 21, p. 4693–4695, 1 nov. 2015.

FISHER, J. P.; YOUNG, C. N.; FADEL, P. J. Autonomic Adjustments to Exercise in Humans. *Em*: **Comprehensive Physiology**. [s.l.] Wiley, 2015. v. 5p. 475–512.

FRAJACOMO, F. T. *et al.* Aerobic Training Activates Interleukin 10 for Colon Anticarcinogenic Effects. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 47, n. 9, p. 1806–1813, 18 set. 2015.

GAROFALO, M. A. R. *et al.* Effect of acute cold exposure on norpinephrine turnover rates in rat white adipose tissue. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 60, n. 3, p. 206–208, set. 1996.

GONÇALVES, D. A. *et al.* Insulin/IGF1 signalling mediates the effects of β 2-adrenergic agonist on muscle proteostasis and growth. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 10, n. 2, p. 455–475, 1 abr. 2019.

GONÇALVES, D. A. P. *et al.* Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, p. 123–133, 2012.

GOODE, J. M. *et al.* The Nuclear Receptor, Nor-1, Induces the Physiological Responses Associated With Exercise. **Molecular Endocrinology**, v. 30, n. 6, p. 660–676, 1 jun. 2016.

GOTO, K. *et al.* Hormone and Recovery Responses to Resistance Exercise with Slow Movement. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 58, n. 1, p. 7–14, 2008.

GRAÇA, F. A. *et al.* Epinephrine depletion exacerbates the fasting-induced protein breakdown in fast-twitch skeletal muscles. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, p. 1483–1494, 2013.

GRAHAM, Z. A. *et al.* Mechanisms of exercise as a preventative measure to muscle wasting. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 321, n. 1, p. C40–C57, 1 jul. 2021.

GREIWE, J. S. *et al.* Norepinephrine response to exercise at the same relative intensity before and after endurance exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v. 86, n. 2, p. 531–535, 1 fev. 1999.

GRUMATI, P. *et al.* Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. **Autophagy**, v. 7, n. 12, p. 1415–1423, 2011.

HAMILTON, D. L. *et al.* A Limited Role for PI(3,4,5)P3 Regulation in Controlling Skeletal Muscle Mass in Response to Resistance Exercise. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11624, 16 jul. 2010.

HORII, N. *et al.* Resistance training prevents muscle fibrosis and atrophy *via* down-regulation of C1q-induced Wnt signaling in senescent mice. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 7, p. 3547–3559, 30 jul. 2018.

HORNBERGER JR., T. A.; FARRAR, R. P. Physiological Hypertrophy of the FHL Muscle Following 8 Weeks of Progressive Resistance Exercise in the Rat. **Canadian Journal of Applied Physiology**, v. 29, n. 1, p. 16–31, 1 fev. 2004.

HU, Z. *et al.* Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. **Journal of Clinical Investigation**, 14 set. 2009a.

____. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, p. 3059–3069, 14 set. 2009b.

JOASSARD, O. R. *et al.* Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 11, p. 2444–2455, nov. 2013.

KATAYAMA, K.; SAITO, M. Muscle sympathetic nerve activity during exercise. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 69, n. 4, p. 589–598, 3 jul. 2019.

KHAN, M. M. *et al.* Sympathetic innervation controls homeostasis of neuromuscular junctions in health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 3, p. 746–750, 19 jan. 2016.

KIDO, K. *et al.* Acute resistance exercise-induced IGF1 expression and subsequent GLUT4 translocation. **Physiological Reports**, v. 4, n. 16, p. e12907, ago. 2016.

KIM, JOUNGMOK *et al.* AMPK activators: Mechanisms of action and physiological activities. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 48, n. 4, p. 1–12, 2016.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Hormonal Responses and Adaptations to Resistance Exercise and Training. **Sports Medicine**, v. 35, n. 4, p. 339–361, 2005.

LECKER, S. H.; GOLDBERG, A. L.; MITCH, W. E. Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 7, p. 1807–1819, jul. 2006.

LOUIS, E. *et al.* Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 5, p. 1744–1751, nov. 2007.

LOURENÇO, Í. *et al.* Muscle hypertrophy and ladder-based resistance training for rodents: A systematic review and meta-analysis. **Physiological Reports**, v. 8, n. 17, p. 1–25, 5 set. 2020.

LYNCH, G. S.; RYALL, J. G. Role of β -Adrenoceptor Signaling in Skeletal Muscle: Implications for Muscle Wasting and Disease. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 2, p. 729–767, abr. 2008.

MACEDO, A. G. *et al.* Effects of exercise training on glucocorticoid-induced muscle atrophy: Literature review. **Steroids**, v. 195, p. 109240, 1 jul. 2023.

MACÊDO SANTIAGO, L. Â. *et al.* Effects of Resistance Training on Immunoinflammatory Response, TNF-Alpha Gene Expression, and Body Composition in Elderly Women. **Journal of Aging Research**, v. 2018, p. 1–10, 28 out. 2018.

MANFREDI, L. H. *et al.* Adrenomedullation activates the Ca²⁺-dependent proteolysis in soleus muscles from rats exposed to cold. **J Appl Physiol**, v. 122, p. 317–326, 2017.

MARKUNS, J. F.; WOJTASZEWSKI, J. F. P.; GOODYEAR, L. J. Insulin and Exercise Decrease Glycogen Synthase Kinase-3 Activity by Different Mechanisms in Rat Skeletal Muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 35, p. 24896–24900, ago. 1999.

MATHUR, S.; BROOKS, D.; CARVALHO, C. R. F. Structural alterations of skeletal muscle in copd. **Frontiers in Physiology**, v. 5, 19 mar. 2014.

MCGLODY, C. *et al.* Application of the [γ -³²P] ATP kinase assay to study anabolic signaling in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 5, p. 504–513, 1 mar. 2014.

MCINTOSH, M. C. *et al.* Different Resistance Exercise Loading Paradigms Similarly Affect Skeletal Muscle Gene Expression Patterns of Myostatin-Related Targets and mTORC1 Signaling Markers. **Cells**, v. 12, n. 6, p. 898, 15 mar. 2023.

MILAN, G. *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin–proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6670, 10 abr. 2015.

MIYAZAKI, M.; TAKEMASA, T. TSC2/Rheb signaling mediates ERK-dependent regulation of mTORC1 activity in C2C12 myoblasts. **FEBS Open Bio**, v. 7, n. 3, p. 424–433, mar. 2017.

NADER, G. A. *et al.* Resistance exercise training modulates acute gene expression during human skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 6, p. 693–702, 15 mar. 2014.

NAVEGANTES, L. C. C. *et al.* Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 277, n. 5, p. E883–E889, 1 nov. 1999.

_____. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n. 4, p. E642–E647, abr. 2004.

ORDELHEIDE, A.-M. *et al.* Nor-1, a novel incretin-responsive regulator of insulin genes and insulin secretion. **Molecular Metabolism**, v. 2, n. 3, p. 243–255, ago. 2013.

PADILHA, C. S. *et al.* β -Resistance exercise attenuates skeletal muscle oxidative stress, systemic pro-inflammatory state, and cachexia in Walker-256 tumor-bearing rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 42, n. 9, p. 916–923, set. 2017.

PADILHA, C. S. *et al.* Moderate vs high-load resistance training on muscular adaptations in rats. **Life Sciences**, v. 238, p. 116964, 1 dez. 2019.

_____. Resistance Training's Ability to Prevent Cancer-induced Muscle Atrophy Extends Anabolic Stimulus. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 53, n. 8, p. 1572–1582, 1 ago. 2021.

PATTAMAPRAPANONT, P. *et al.* Muscle Contraction Induces Acute Hydroxymethylation of the Exercise-Responsive Gene Nr4a3. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, n. DEC, 23 dez. 2016.

PEAREN, M. A. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor, NOR-1, Is a Target of Adrenergic Signaling in Skeletal Muscle. **Endocrinology**, v. 147, n. 11, p. 5217–5227, 1 nov. 2006.

PEAREN, M. A. *et al.* Expression profiling of skeletal muscle following acute and chronic β 2-adrenergic stimulation: implications for hypertrophy, metabolism and circadian rhythm. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 448, 23 dez. 2009.

PEDERSEN, B. K. Muscle as a Secretory Organ. *Em: Comprehensive Physiology*. [s.l.] Wiley, 2013. v. 3p. 1337–1362.

PHILLIPS, S. M. *et al.* Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 273, n. 1, p. E99–E107, 1 jul. 1997a.

_____. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 273, n. 1, p. E99–E107, 1 jul. 1997b.

PICCIRILLO, R. Exercise-Induced Myokines With Therapeutic Potential for Muscle Wasting. **Frontiers in Physiology**, v. 10, 29 mar. 2019.

PILLON, N. J. *et al.* Transcriptomic profiling of skeletal muscle adaptations to exercise and inactivity. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 470, 24 jan. 2020a.

____. Transcriptomic profiling of skeletal muscle adaptations to exercise and inactivity. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 470, 24 dez. 2020b.

PLANELLA-FARRUGIA, C. *et al.* Circulating Irisin and Myostatin as Markers of Muscle Strength and Physical Condition in Elderly Subjects. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. JUL, 10 jul. 2019.

RAASTAD, T.; BJØRO, T.; HALLÉN, J. Hormonal responses to high- and moderate-intensity strength exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 1–2, p. 121–128, 15 maio 2000.

RICHTER, E. A. *et al.* Differential effect of bicycling exercise intensity on activity and phosphorylation of atypical protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase in skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 560, n. 3, p. 909–918, nov. 2004.

RODRIGUES, ANNA C. Z. *et al.* The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability. **Acta Physiologica**, v. 225, n. 3, 22 mar. 2019a.

____. The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability. **Acta Physiologica**, v. 225, n. 3, 22 mar. 2019b.

RODRIGUES, ANNA C Z *et al.* The sympathetic nervous system regulates skeletal muscle motor innervation and acetylcholine receptor stability. **Acta Physiologica**, v. 225, n. 3, 22 mar. 2019.

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. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 1009–1013, 5 nov. 2001.

ROSE, A. J.; KIENS, B.; RICHTER, E. A. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. **The Journal of Physiology**, v. 574, n. 3, p. 889–903, 1 ago. 2006.

ROUBENOFF, R.; HUGHES, V. A. **Sarcopenia: Current Concepts** *Journal of Gerontology*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/55/12/M716/555921>>.

ROWELL, L. B.; O'LEARY, D. S. Reflex control of the circulation during exercise: chemoreflexes and mechanoreflexes. **Journal of Applied Physiology**, v. 69, n. 2, p. 407–418, 1 ago. 1990.

RUAS, J. L. *et al.* A PGC-1 α Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy. **Cell**, v. 151, n. 6, p. 1319–1331, 7 dez. 2012.

RYALL, J. G.; SILLENCE, M. N.; LYNCH, G. S. Systemic administration of β 2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 6, p. 587–595, mar. 2006.

SAKAMOTO, K. *et al.* Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, n. 2, p. 419–425, jun. 2004.

SANTANA, F. M. *et al.* Association of Appendicular Lean Mass, and Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue With Mortality in Older Brazilians: The São Paulo Ageing & Health Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 34, n. 7, p. 1264–1274, 28 jul. 2019.

SARTORI, R.; ROMANELLO, V.; SANDRI, M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 330, 12 dez. 2021.

SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, p. 4, 2011.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 jun. 2008.

SCHNYDER, S.; HANDSCHIN, C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. **Bone**, v. 80, p. 115–125, 1 nov. 2015.

SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 821–861, jun. 1999.

SILVEIRA, W. A. *et al.* Activating cAMP/PKA signaling in skeletal muscle suppresses the ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis: implications for sympathetic regulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 1, p. 11–19, 1 jul. 2014.

SILVEIRA, W. A. *et al.* cAMP-dependent protein kinase inhibits FoxO activity and regulates skeletal muscle plasticity in mice. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 9, p. 12946–12962, 9 set. 2020.

SILVESTRE, J. G. O. *et al.* Acute effects of Resistance exercise performed on ladder on energy metabolism, stress, and muscle damage in rats. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 23, n. spe, 2017.

TAKEMORI, H. *et al.* Inactivation of HDAC5 by SIK1 in AICAR-treated C2C12 Myoblasts. **Endocrine Journal**, v. 56, n. 1, p. 121–130, 2009a.

_____. Inactivation of HDAC5 by SIK1 in AICAR-treated C2C12 Myoblasts. **Endocrine Journal**, v. 56, n. 1, p. 121–130, 2009b.

TESTA, M. T. DE J. *et al.* Resistance Training Attenuates Activation of STAT3 and Muscle Atrophy in Tumor-Bearing Mice. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 1 jul. 2022.

THOMSON, D. M. *et al.* AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 2, p. 429–438, fev. 2008a.

_____. AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 2, p. 429–438, fev. 2008b.

TISDALE, M. J. Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. **Physiology**, v. 20, n. 5, p. 340–348, out. 2005.

WEI ZHANG; JOHN GARVERY W.; NANLAN LUO; W TIMOTHY GARVERY; YUCHANG FU. MINOR (NR4A3) Overexpression in Mouse Skeletal Muscle Enhances Insulin Action. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. 02, n. s1, 2014.

WEN, X. *et al.* Effect of Exercise Intensity on Isoform-Specific Expressions of NT-PGC-1 α mRNA in Mouse Skeletal Muscle. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

WILKINSON, S. B. *et al.* Differential effects of resistance and endurance exercise in the fed state on signalling molecule phosphorylation and protein synthesis in human muscle. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 15, p. 3701–3717, 1 ago. 2008.

WOJTASZEWSKI, J. F. P. *et al.* Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 528, n. 1, p. 221–226, out. 2000.

YANG, J.-Y. *et al.* ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 138–148, 20 fev. 2008a.

_____. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 138–148, 20 fev. 2008b.

ZHAO, J. *et al.* FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells. **Cell Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 472–483, dez. 2007.

FIGURE LEGENDS

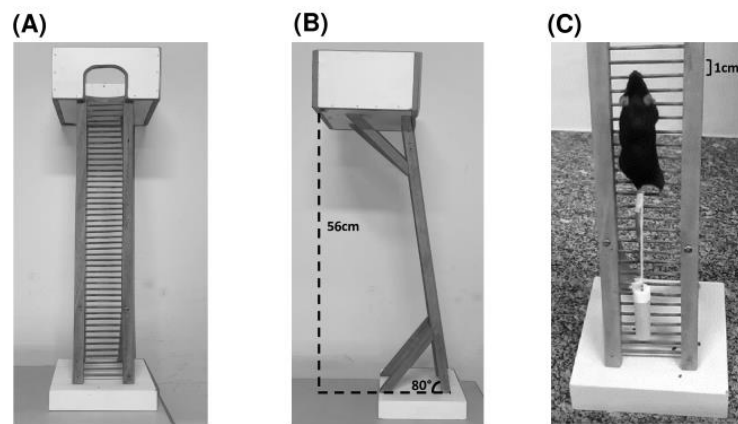


Figure 1. (A) The apparatus for resistance exercise (RE) in mice. (B) At the top of the ladder is a housing chamber where the mice are allowed to rest between climbs (60 sec). (C) A mouse is shown climbing a 56cm, 80° incline ladder with the weight attached to the tail.

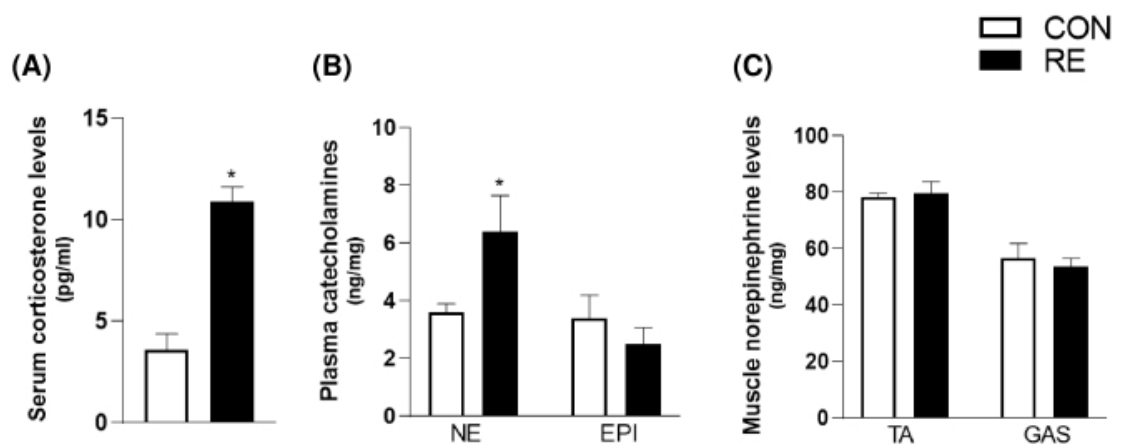


Figure 2. Acute effect of a single bout of resistance exercise (RE) on the activation of sympathetic-adrenomedullary and the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis of mice. (A) Serum corticosterone, (B) plasma catecholamines and (C) content of norepinephrine in *tibialis anterior* (TA) and *gastrocnemius* (GAS) muscles from exercised mice. Data are presented as mean \pm SEM of 7-8 mice. (* $p \leq 0.05$ vs CON group, Student's t-test). NE, norepinephrine; EPI, epinephrine.

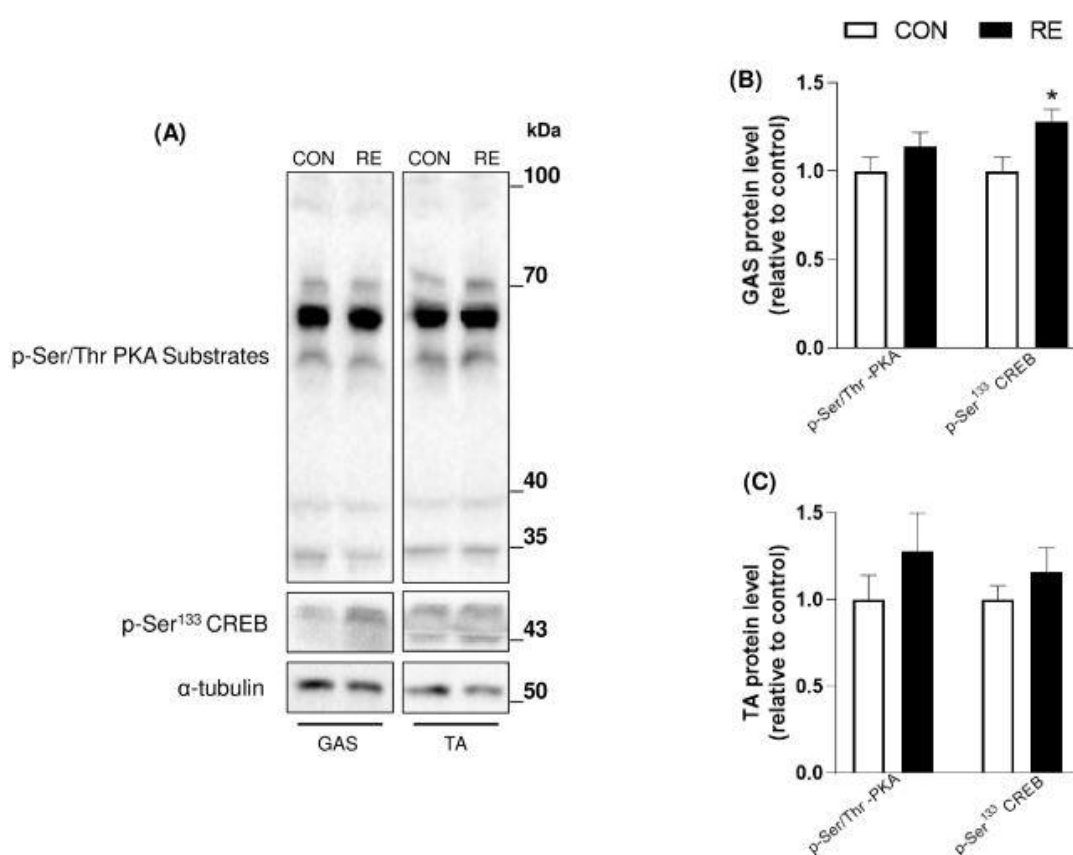


Figure 3. Acute effect of a single bout of resistance exercise (RE) on the PKA/CREB signaling pathway in skeletal muscle from mice. (A) Representative western blots of phosphorylation levels of PKA substrates and CREB in muscles of exercised mice. (B and C) Densitometric and statistical analysis of the p-Ser/Thr PKA substrates and p-Ser¹³³ CREB protein content in (B) *gastrocnemius* (GAS) and (C) *tibialis anterior* (TA)

muscles. Phosphorylated proteins were normalized to α -tubulin. Data are presented as mean \pm SE of 7-8 muscles. (* $P \leq 0.05$ vs CON group, Student's t -test).

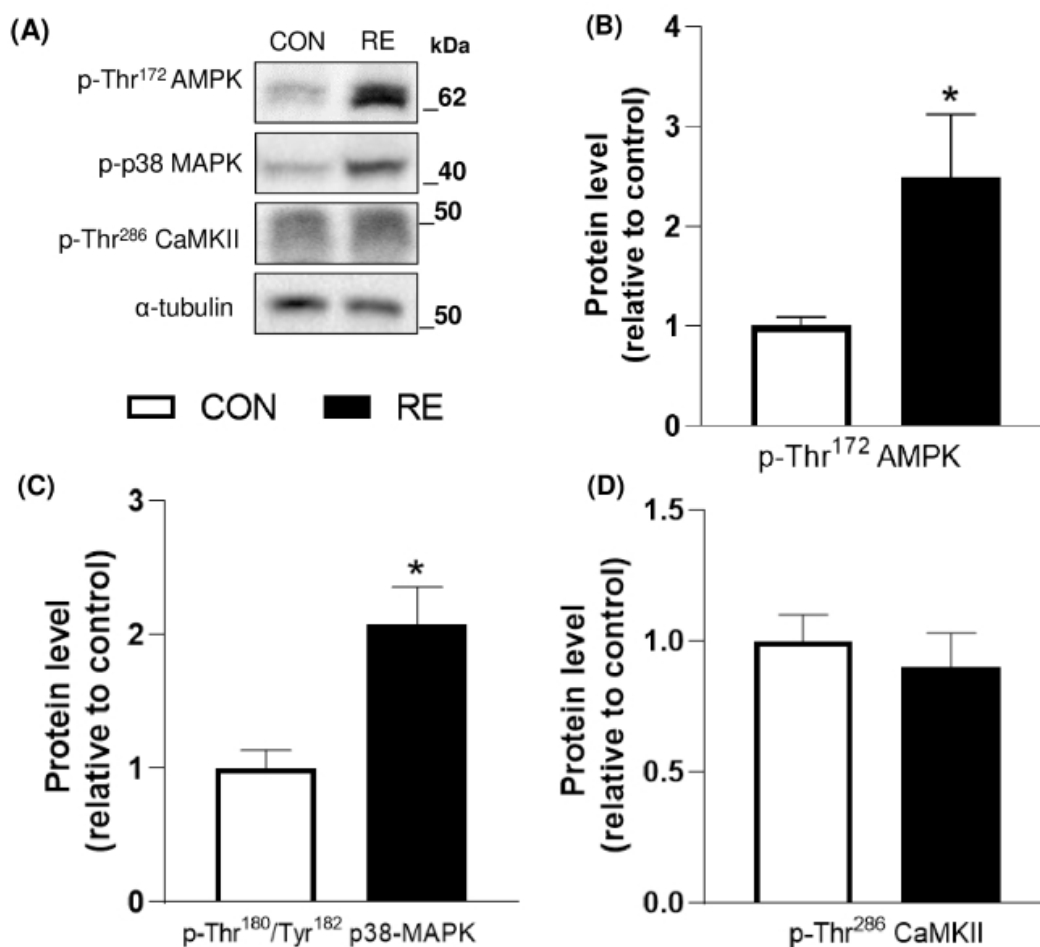


Figure 4. Acute effect of a single bout of resistance exercise (RE) on the activation of AMPK, p38 MAPK and CaMKII signaling in muscles of exercised mice. (A) Representative western blots of phosphorylation levels of AMPK, p38 MAPK and CaMKII in *gastrocnemius* (GAS) muscles of exercised mice. (B, C and D) Densitometric and statistical analysis of the (B) p-Thr¹⁷²AMPK, (C) p-Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² p38 MAPK and (D) p-Thr²⁸⁶ CaMKII protein content presented in Figure 4A. Phosphorylated proteins were normalized to α -tubulin. Data are presented as mean \pm SEM of 7-8 muscles. (* $P \leq .05$ vs CON group, Student's t -test).

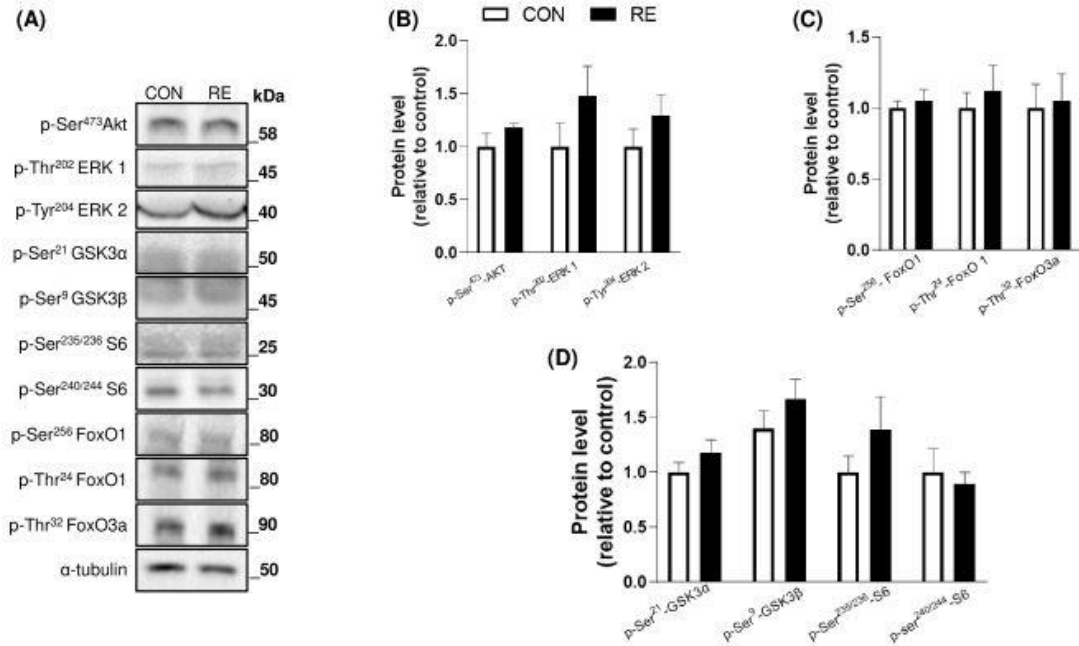


Figure 5. Acute effect of a single bout of resistance exercise (RE) on the Insulin/IGF-1 signaling in muscles of exercised mice. (A) Representative western blot of phosphorylation levels of Akt, ERK1/2, GSK3, S6, FoxO1 and FoxO3 in *gastrocnemius* (GAS) muscles of exercised mice. (B, C and D) Densitometric and statistical analysis of the (B) Akt and ERK/12; (C) FoxO1 and FoxO3a; and (D) GSK3 and S6 protein content. Phosphorylated proteins were normalized to α -tubulin. Data are presented as mean \pm SEM of 7-8 muscles. (* $P \leq 0.05$ vs CON group, Student's *t*-test).

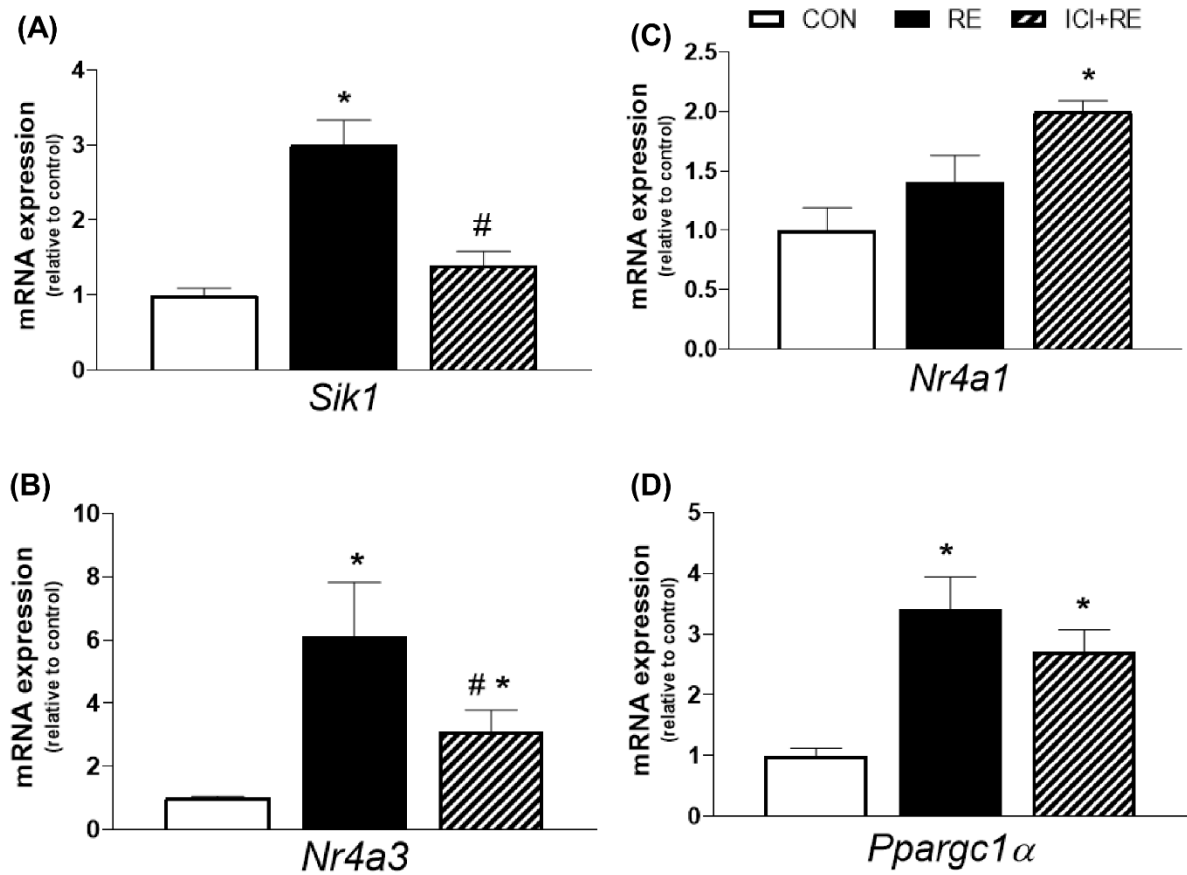


Figure 6. Effect of the β_2 -AR blockade on CREB-target genes expression in skeletal muscle of exercised mice. (A) *Sik1* and *Nr4a3*; and (B) *Nr4a1* and *ppargc1α* mRNA levels in *gastrocnemius* (GAS) muscles from exercised mice pre-treated with β_2 -AR antagonist ICI 118,551 (single dose - 10 mg.kg⁻¹, i.p., 30 min prior RE). Data are presented as mean \pm SEM of 6-7 muscles. (* $p \leq 0.05$ vs CON group, # $p < 0.05$ vs RE group, bidirectional AVONA test).

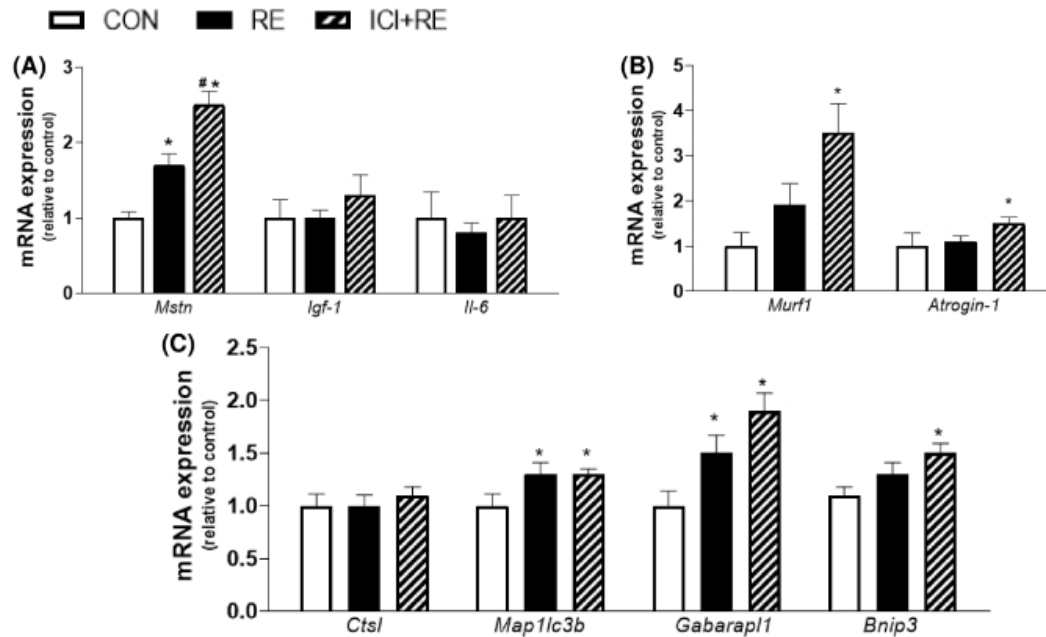


Figure 7. Effect of the β_2 -AR blockade on the mRNA levels of genes involved in metabolism and plasticity in muscles of exercised mice. (A) *Mstn*, *igf-1* and *Il-6* (myokines); (B) *Murf1* and *Atrogin-1* (atrophy-related genes); and (C) *Ctsl*, *map1lc3b*, *Gabarapl1* and *Bnip3* mRNA levels (autophagy-related genes) in *gastrocnemius* (GAS) muscles of exercised mice pre-treated with β_2 -AR antagonist ICI 118,551 (single dose; 10 mg.kg⁻¹, i.p., 30 min prior RE). Data are presented as mean \pm SEM of 6-7 muscles. (* $p \leq 0.05$ vs CON group, # $p < 0.05$ vs RE group, bidirectional AVONA test).

Table 1. Antibodies for western blot

Protein	Dilution for WB	Manufacturer
phospho-Ser ¹³³ CREB	1:2000	Cell Signaling
phospho-Ser/Thr PKA	1:1000	Cell Signaling
phospho-Thr ¹⁷² AMPK	1:1000	Cell Signaling
phospho-Ser ²⁵⁶ FoxO1	1:4000	Cell Signaling
phospho-Thr ²⁴ FoxO1	1:4000	Cell Signaling
phospho-Thr ³² FoxO3	1:4000	Cell Signaling
phospho-Thr ²⁰² ERK1	1:2000	Cell Signaling
phospho-Tyr ²⁰⁴ ERK2	1:2000	Cell Signaling
phospho-Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸² p38-MAPK	1:1000	Cell Signaling
phospho-Ser ⁴⁷³ AKT	1:1000	Cell Signaling
phospho-Ser ^{235/236} S6	1:1000	Cell Signaling
phospho-Ser ^{240/244} S6	1:1000	Cell Signaling
phospho-Ser ²¹ GSK3 α	1:1000	Cell Signaling

phospho-Ser ⁹ GSK3 β	1:1000	Cell Signaling
phospho-Thr ²⁸⁶ CaMKII	1:1000	Cell Signaling

Table 2. Oligonucleotide primers used for qPCR analysis

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (3'-5')
<i>Ppargc1a</i>	AATCCAGCGGTCTTAGCACT	TTTCTGTGGGTTTGGTGTGA
<i>Sik1</i>	TCCACCACCAAATCTCACCG	GTTTCGGCGCTGCCTCTTC
<i>Map1lc3b</i>	CGTCCTGGACAAGACCAAGT	TCCGTCCTTCGCTTCATAGG
<i>Gabarapl1</i>	CATCGTGGAGAAGGCTCCTA	ATACAGCTGGCCCATGGTAG
<i>Ctsl</i>	CATCGTGGAGAAGGCTCCTA	ATACAGCTGGCCCATGGTAG
<i>Bnip3</i>	TTCCACTAGCACCTTCTGATGA	GAACACCGCATTTACAGAACAA
<i>Nr4a1</i>	AGCTTGGGTGTTGATGTTCC	AATGCGATTCTGCAGCTCTT
<i>Nr4a3</i>	TGCAGAGCCTGAACCTTGAT	TTAACCCATGTGCGCTCTGTG
<i>Mstn</i>	TTGCAAAATTGGCTCAAACAGC	AAGGGATTCAGCCCATCTTCTC
<i>Igf-1</i>	CTCAGACAGGCATTGTGGATGAGT	GGTCTTGTTTCCTGCACTTCCTCT
<i>Il-6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>Murf1</i>	TGTGCAAGGAACACGAAG	TGAGAGATGATCGTCTGC
<i>Atrogin-1</i>	GCAGAGAGTCGGCAAGTC	CAGGTCGGTGATCGTGAG

Table 3. Body mass and maximum voluntary carrying capacity (MVCC) data.

Parameter	CON	RE	RE+ICI
Body mass (g)	21,6 \pm 0,7	21,8 \pm 1,49	21,1 \pm 0,6
Maximal load (g)	43,7 \pm 1,3	41,7 \pm 1,1	42,8 \pm 0,7
Number of climbs	-	9,0 \pm 1,2	10,0 \pm 0,7
Training volume (g)	-	290,69 \pm 23,7	326,8 \pm 24,3
Protocol time (min)	-	16,0 \pm 0,9	14,5 \pm 1,2

All values are presented as means \pm standard error of the mean; CON: control group; RE: resistance exercise group; ICI+RE: resistance exercise under β_2 -AR blockade group.

APÊNCIDE B – comprovante de submissão



RONALDO ABDALLA <contato.ronaldoabdalla@gmail.com>

Your manuscript submission - 1268380

1 mensagem

Frontiers in Physiology <physiology.editorial.office@frontiersin.org>

27 de julho de 2023 às
20:56

Responder a: Frontiers in Physiology <physiology.editorial.office@frontiersin.org>

Para: Ronaldo Abdalla-Silva <contato.ronaldoabdalla@gmail.com>

Dear Dr Abdalla-Silva

We are pleased to inform you that we have received the manuscript " β 2-ADRENOCEPTOR ACTIVATION REGULATES MUSCLE TROPHIC-RELATED GENES FOLLOWING ACUTE RESISTANCE EXERCISE IN MICE" to be considered for publication in Frontiers in Physiology, section Exercise Physiology.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

If you have already created a Frontiers account using a different email address, please add this one as a secondary email to your Frontiers profile following this link:

<https://loop.frontiersin.org/settings/email>

For any questions on the above, you can contact support@frontiersin.org

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Best regards,
Your Frontiers in Physiology Team,

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
Avenue du Tribunal Fédéral 34
1005 Lausanne Switzerland

For technical issues please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (helpcenter.frontiersin.org)

————MANUSCRIPT DETAILS————

Manuscript title: β 2-ADRENOCEPTOR ACTIVATION REGULATES MUSCLE TROPHIC-RELATED GENES FOLLOWING ACUTE RESISTANCE EXERCISE IN MICE

Manuscript ID: 1268380

Submitted By: Wiliam Assis Silveira

Authors: Ronaldo Luis Abdalla-Silva, Gustavo Oliveira Zanetti, Natália Ennes Silva Lautherbach, Lilian Carmo Heck, DAWIT ALBIEIRO PINHEIRO GONÇALVES, Isis Carmo Kettelhut, Luiz Carvalho Navegantes and Wiliam Assis Silveira

Journal: Frontiers in Physiology, section Exercise Physiology

Research Topic: Metabolic Responses and Adaptations to Exercise

Article type: Original Research

Submitted on: 27 Jul 2023

————ADDITIONAL INFORMATION————

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=415&name=exercise_physiology

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: https://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf

If you encounter any technical issue, contact support@frontiersin.org, with XB8zGuRFLbEI112 as reference.