

## TRANSPORTADOR DE MONOCARBOXILATO 4 (MCT-4) EM MÚSCULO OXIDATIVO DE CAMUNDONGOS APÓS CORRIDA MÁXIMA EM INTENSIDADE DE VELOCIDADE CRÍTICA

Juan B. Orsi\*, Pedro P. M. Scariot, Lara S. de Araujo, Luisa O. Cardoso, Claudio A. Gobatto, Fúlvia B. Manchado-Gobatto

### Resumo

O presente estudo objetivou determinar o conteúdo proteico do transportador de monocarboxilato 4 (MCT-4) em músculo oxidativo (sóleo) de camundongos submetidos corrida máxima em intensidade de velocidade crítica ( $V_{crit}$ ), correlacionando-os com o tempo de manutenção de esforço em intensidade individualizada de velocidade crítica. Para isso, 14 camundongos C57BL/6J foram submetidos ao protocolo para identificação da  $V_{crit}$  e capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e, posteriormente, a uma corrida até a exaustão na intensidade individualizada de  $V_{crit}$ , com obtenção de materiais biológicos logo após esse esforço. Para possibilitar as análises moleculares comparativas, mesmo número de animais ( $n=14$ ) permaneceram em repouso, sendo considerados o grupo controle. A  $V_{crit}$  e CCA do grupo experimental foi, respectivamente,  $21,3 \pm 0,9 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$  e  $8,4 \pm 2,0 \text{ m}$ , com média de  $R^2 = 0,99 \pm 0,002$ , notabilizando alta confiabilidade na determinação desses parâmetros. Os animais que foram submetidos à corrida até a exaustão em intensidade de  $V_{crit}$  obtiveram o tempo limite (tlim) de  $1703 \pm 133 \text{ s}$  (~28min). No que diz respeito a determinação protéica de MCT-4 na musculatura esquelética oxidativa, não houve diferença entre os grupos exercitado e controle. Não foram observadas correlações significativas entre tlim e os conteúdos de MCT-4 ( $r = -0,31$ ,  $p = 0,289$ ), e entre  $V_{crit}$  e MCT-4 ( $r = 0,21$ ,  $p = 0,472$ ). A partir dos resultados obtidos é possível concluir que apenas uma sessão de exercício em velocidade crítica até a exaustão não é capaz de modular o conteúdo protéico de MCT-4 em músculo esquelético oxidativo (sóleo). Ademais, o tempo de exaustão não foi associado ao conteúdo protéico de MCT-4.

### Introdução

O exercício físico é compreendido como um importante modulador de vias de sinalização molecular. Há evidências de que apenas uma sessão de esforço físico é capaz de desencadear uma série de respostas celulares que resultam na transcrição e tradução de proteínas (de ARAUJO et al., 2004). Alterações proteicas em nível celular certamente contribuem para as adaptações fisiológicas e de desempenho físico (PEREZ DE HEREDIA et al., 2010; ROCHA, 2007; HON et al., 2002; LIN et al., 2002). Sabe-se que as proteínas relacionados ao transporte de lactato (transportadores de monocarboxilatos - MCTs) possuem forte sensibilidade à exposição ao exercício físico (NIKOOIE et al., 2013). Em linha com isso, de ARAUJO et al. (2004) observaram aumento da expressão gênica de MCTs em músculo oxidativo (sóleo) de camundongos logo após uma única sessão de natação realizada em intensidade aeróbia equivalente à máxima fase estável de lactato (MFEL), corroborando com a literatura que sinaliza a relevante contribuição das MCTs sobre o equilíbrio ácido-básico (JUEL e HALESTRAP, 1999; PETERSEN et al., 2017). À vista disso, acreditamos fortemente que os conteúdos proteicos dos MCTs em músculos esqueléticos estejam relacionados à estabilidade fisiológica do organismo, necessária para a manutenção de esforços contínuos em intensidades equivalentes ao limiar anaeróbio e velocidade crítica realizados até a exaustão física (isto é, tempo limite – tlim), o qual apresenta importante variação interindivíduos. Desse modo, os objetivos do presente estudo foram: 1) verificar se apenas uma sessão de exercício em intensidade individualizada de velocidade crítica (esforço até a exaustão) já é capaz de modular o conteúdo proteico de MCT-4 em

musculo sóleo; 2) examinar se o tempo de exaustão apresenta correlação significativa com o conteúdo proteico de MCT-4.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais e local**

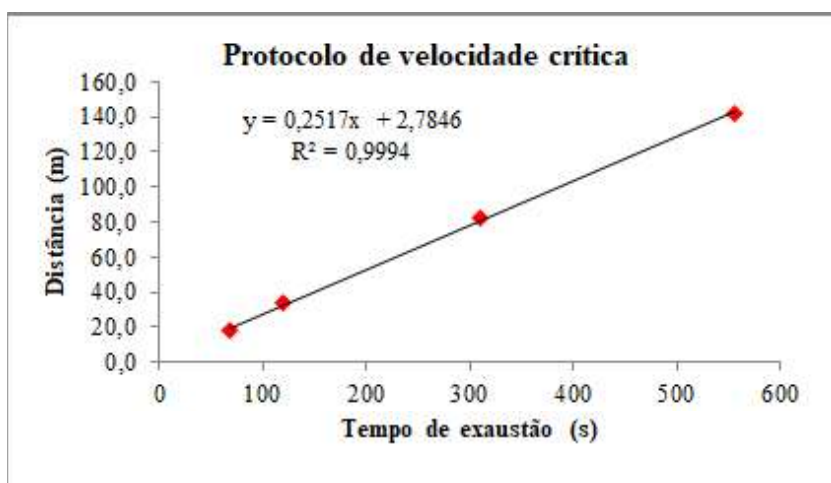
Foram utilizados camundongos C57BL/6J (animais provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB – UNICAMP, e mantidos no Biotério de Ciências do Esporte da Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA - UNICAMP, Campus de Limeira – SP). Os roedores foram alojados em gaiolas de polipropileno (10 camundongos por gaiola), mantidos em estantes ventiladas (Alesco), alocados em ambiente climatizado a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ , umidade relativa do ar entre 45 e 55%, iluminação controlada em ciclo claro/escuro 12/12h (luz acesa das 6 às 18h), sendo alimentados com ração balanceada Labina-Purina® para roedores e água *ad libitum*. Os ruídos no biotério não ultrapassaram 85 decibéis sob qualquer hipótese. Todo o experimento envolvendo avaliação física e prescrição do esforço foi realizado de acordo com a legislação Brasileira corrente e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo os procedimentos previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA – UNICAMP (processo nº 4940-1/2018). Todos os protocolos físicos foram conduzidos em sala específica para avaliação e treinamento de roedores do Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte – LAFAE – UNICAMP, no mesmo período do dia (das 18 às 20h).

### **Desenho experimental**

Aos sessenta dias de idade os animais foram recebidos pelo Biotério local, onde foram mantidos até os cento e cinquenta dias para atingirem idade alvo (150 dias). A partir dessa idade, foram adaptados à corrida em esteira rolante por um período de cinco dias. Posteriormente, os camundongos executaram o protocolo para determinação de velocidade crítica ( $V_{crit}$ ) e capacidade de corrida anaeróbia (CCA). Após 48 horas da última sessão do protocolo avaliativo, os roedores foram submetidos à corrida em intensidade equivalente à  $V_{crit}$  individual, sendo o tlim de exercício registrado por um cronômetro. Imediatamente após o esforço, os roedores foram eutanasiados para a obtenção de materiais biológicos e posterior análise, conforme detalhamentos a seguir. Para permitir a análise comparativa entre os conteúdos protéicos de MCT-4 em condições de repouso e após de esforço, outro grupo de animais de mesma idade e mantido em mesmas condições de alojamento foi eutanasiado, sem executar previamente a corrida.

### **Protocolo de velocidade crítica adaptado à camundongos**

As determinações das capacidades aeróbia e anaeróbia seguiu os pressupostos do modelo de velocidade crítica adaptado para ratos Wistar por Manchado-Gobatto et al. (2011) e para camundongos por Scariot et al. (2019). Após período de adaptação à corrida em esteira rolante, os camundongos realizaram quatro sessões de exercício caracterizadas por corridas contínuas até a exaustão e separadas por intervalo de 24 a 48 horas. As intensidades foram individualmente selecionadas para que o tlim nas cargas preditivas ocorresse dentro da faixa sugerida pelo modelo (1 a 10 minutos). A partir de uma relação linear entre ‘distância vs. tlim’ foi possível determinar o coeficiente angular e o intercepto y, os quais correspondem, respectivamente, à  $V_{crit}$  e CCA, conforme ilustrado na figura 1.



**Figura 1.** Exemplo representativo da relação linear entre distância vs. tempo limite para determinação da velocidade crítica e capacidade de corrida anaeróbia.

### Exercício agudo em intensidade de corrida equivalente à Vcrit

Após a identificação da Vcrit e CCA, os animais foram individualmente submetidos ao exercício de corrida em esteira rolante, em intensidade equivalente à Vcrit. Nesse esforço contínuo, realizados até a exaustão, houve registro do tlim. Imediatamente após esse estímulo agudo, os camundongos foram eutanasiados.

### Obtenção de material biológico e Western Blotting

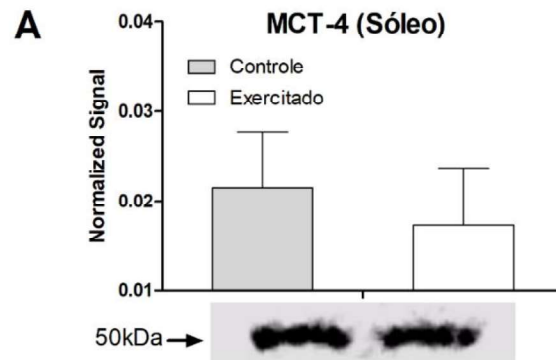
A eutanásia foi efetuada pelo método químico, por meio de administração intraperitoneal de tiopental sódico. Após a total perda dos reflexos, a toracotomia foi efetuada. O músculo sóleo foi coletado e rapidamente depositado em nitrogênio líquido para evitar a degradação tecidual, sendo posteriormente armazenado à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os tecidos foram macerados em RIPA *buffer*, e posteriormente sonicados. Após a determinação de proteínas totais,  $9\mu\text{L}$  de cada amostra (sempre totalizando  $40\mu\text{g}$  de proteínas) juntamente com  $3\mu\text{L}$  de LDS *buffer* foram depositados em poços unitários de gel (Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 15-well) para corrida de eletroforese. As proteínas foram transferidas do gel para as membranas (iBlot® 2 Dry Blotting System). O valor total de proteína de cada *lane* da membrana foi determinado por meio de *Revert total protein stain kit* e lido em fluorescência (Odyssey-Li-COR, canal 700). Após serem bloqueadas em 1% leite em PBS, as membranas foram incubadas (1h) com anticorpo primário (MCT4, Bioss®). Após lavagens com PBST, as membranas foram incubadas (1h) anticorpo secundário para leitura da fluorescência em 800nm (Odyssey-Li-COR).

### Análise estatística

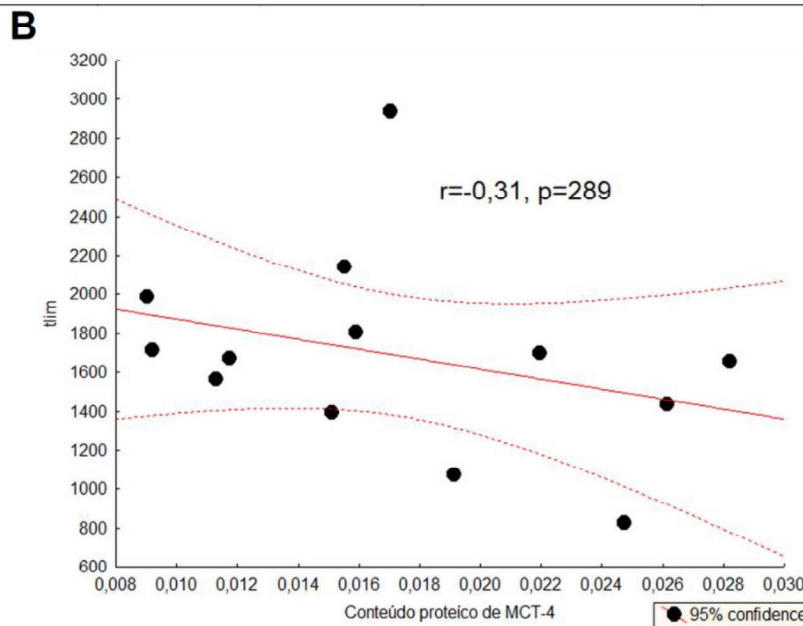
Todos resultados obtidos pelo projeto estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk e a homogeneidade, por teste Levene. Para a analisar as diferenças entre grupos (Controle vs Exercitado) utilizou-se teste t para amostra independentes. Correlações entre tlim em intensidade equivalente à Vcrit, e conteúdo proteicos de MCT-4 em músculo sóleo foram investigadas por produto-momento de Pearson. Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5%.

## Resultados

A  $V_{crit}$  e a CCA dos animais exercitados foi  $21,3 \pm 0,9 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$  e  $8,4 \pm 2,0 \text{ m}$ , respectivamente. Todas as regressões lineares apresentaram elevados valores de  $R^2$  ( $0,99 \pm 0,002$ ), evidenciando uma elevada confiabilidade na determinação dos parâmetros aeróbio e anaeróbio advindos desse modelo. Para os animais que foram individualmente submetidos ao exercício de corrida em esteira rolante ( $n=14$ ), em intensidade equivalente à  $V_{crit}$ , o  $t_{lim}$  foi de  $1703 \pm 133 \text{ s}$  ( $\sim 28 \text{ min}$ ). Quanto à determinação do conteúdo protéico de MCT-4 em músculo sóleo, não houve diferença entre o grupo exercitado e controle (figura 2). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a o  $t_{lim}$  e os conteúdos de MCT-4 ( $r=-0,31$ ,  $p=0,289$ ), e entre  $V_{crit}$  e MCT-4 ( $r=-0,21$ ,  $p=0,472$ ).



	Controle (n=11)	Exercitado (n=13)	Comparações estatísticas	Effect Size
MCT-4	0,0215±0,0019	0,0173±0,0018	t=1,60; p=0,12	0,657



**Figura 1:** Comparação entre o conteúdo proteico de MCT-4 em músculo sóleo de animais controle e exercitado (Painel A). Correlações entre tempo de exaustão ( $t_{lim}$ ) em intensidade equivalente à  $V_{crit}$ , e conteúdo protéicos de MCT-4 em músculo sóleo, investigadas por produto-momento de Pearson (Painel B).

## Discussão

Tendo em vista que De ARAÚJO et al. (2004) reportaram aumento da expressão gênica de MCT-4 em músculo oxidativo (sóleo) de camundongos logo após uma única sessão de natação realizado em intensidade aeróbia (MFEL), acreditávamos ser possível visualizar maior conteúdo proteico de MCT-4 em músculo sóleo em animais exercitados quando comparados à animais controles (sem nenhum estímulo). Em conjunto com os achados de De ARAÚJO et al. (2004), nossos resultados demonstram que os níveis de mRNA não necessariamente refletem os perfis de expressão proteica, reforçando a existência de vários mecanismos que atuam, desde a transcrição do gene, até a obtenção da proteína na forma ativa. Mecanismos pós-transcricionais podem explicar por que um aumento do conteúdo proteico nem sempre ocorre após um estímulo na expressão gênica. Outra possibilidade para explicar a ausência de diferença entre os grupos está relacionada ao tempo de análise das proteínas após o estímulo do esforço. Embora a eutanásia dos animais tenha sido realizada imediatamente após o tlim, com o intuito de examinar elementos que contribuíram para a manutenção do esforço, torna-se necessário estudar momentos mais tardios após a exposição ao exercício. Assim, análises *time course* parecem ser relevantes para compreender como se dão os ajustes nas MCTs em algumas horas após o esforço em intensidade aeróbia. Com relação ao segundo objetivo do estudo, vale mencionar que uma elevada capacidade muscular de efetuar a extrusão de lactato (MCT-4) poderia explicar maior tlim. Apesar de não termos encontrado associação entre tlim e MCT-4, é importante relatar que a tolerância ao esforço é absolutamente dependente das MCTs. Futuras investigações serão conduzidas na tentativa de compreender como outras isoformas de MCTs, em diferentes tecidos, se associam com o tlim em esforços constantes e individualizados de corrida.

## Conclusão

Nossos resultados sugerem que uma sessão de exercício em intensidade individualizada de velocidade crítica (esforço até a exaustão) não é capaz de modular o conteúdo proteico de MCT-4 em músculo sóleo. Além disso, o tempo de exaustão em corrida contínua realizada nessa intensidade não apresentou correlações significantes com o conteúdo proteico de MCT-4, ao menos em relação ao músculo sóleo.

## Referências

- DE ARAUJO, Gustavo Gomes et al. MCT1 and MCT4 kinetic of mRNA expression in different tissues after aerobic exercise at maximal lactate steady state workload. **Physiological research**, 2015.
- HON, W.C., WILSON, M.I., HARLOS, K. et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. **Nature**, v. 417, p. 975-978, 2002.
- JUEL, Carsten; HALESTRAP, Andrew P. Lactate transport in skeletal muscle—role and regulation of the monocarboxylate transporter. **The Journal of physiology**, v. 517, n. 3, p. 633-642, 1999.
- LIN, J., WU, H., TARR, P.T. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v.418, p.797-80, 2002.
- NIKOOIE, Rohollah et al. Exercise-induced changes of MCT1 in cardiac and skeletal muscles of diabetic rats induced by high-fat diet and STZ. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 865-877, 2013.
- PEREZ DE HEREDIA, F., WOOD, I.S., TRAYHURN, P. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. **Eur J Physiol**, v.459, p. 509-518, 2010.
- PETERSEN, Charlotte et al. MCT1 and MCT4 expression and lactate flux activity increase during white and brown adipogenesis and impact adipocyte metabolism. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.
- ROCHA, S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. **Trends Biochem Sci**, v. 32, p.389-397, 2007.