

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

**EXPRESSÃO DE MCT1 E MCT4 EM TECIDOS ATIVOS E INATIVOS DE
CAMUNDONGOS APÓS SESSÃO AGUDA DE NATAÇÃO NA MÁXIMA
FASE ESTÁVEL DO LACTATO**

LUIS FELIPE MILANO TEIXEIRA

PIRACICABA

2008

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

**EXPRESSÃO DE MCT1 E MCT4 EM TECIDOS ATIVOS E INATIVOS DE
CAMUNDONGOS APÓS SESSÃO AGUDA DE NATAÇÃO NA MÁXIMA
FASE ESTÁVEL DO LACTATO**

LUIS FELIPE MILANO TEIXEIRA

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade Metodista de Piracicaba, como
requisito final para obtenção do grau de
Mestre em Educação Física, na área de
concentração em Performance Humana, sob
orientação da Professora Dra. Rozangela
Verlengia.

PIRACICABA

2008

Se fosse fácil achar o caminho das pedras,
tantas pedras no caminho não seria ruim.

(Humberto Gessinger)

Dedico este trabalho com todo o carinho, amor e gratidão àqueles que estavam, e sempre estarão ao meu lado, em todos os momentos da minha vida: Minha mãe Raquel; Meu pai Paulo; Minha irmã Natalia; Meus avós Nelson e Iracy; e meu pai Luiz Carlos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me proporcionar uma vida cheia de graça e benção, repleta de pessoas maravilhosas, sem às quais jamais seria capaz de buscar e atingir nenhum dos objetivos que já alcancei até esse momento.

A todos os meus amigos (em especial: César, Raphael, Daniel, Wallace, Edjan e Carlinhos), por me incentivarem a concluir essa etapa, por compreenderem os momentos de ausência e por dedicarem o amor que só a amizade é capaz de proporcionar.

A professora Rozangela Verlengia, pela dedicação e amizade, por todo o conhecimento que paciente e generosamente forneceu nesses anos, mas principalmente, pelo exemplo de vida.

Ao professor e amigo Marcelo Conte, cujo exemplo de pessoa esta fortemente presente na minha formação profissional e pessoal, por ter acreditado no meu potencial desde os tempos de graduação, por ter proporcionado tantas oportunidades de crescimento profissional e pessoal nesses últimos sete anos, mas, sobretudo, pelo exemplo de ser humano, de hombridade, amizade, honestidade e tudo que um homem tem que ser e ter para que sua passagem na terra seja marcante a todos com quem convive.

Aos amigos de Sorocaba, Sérgio Paulo (Ratão), Roberto Vazatta, Mauro Riyes, Vladimir Godoy, Hélio, Hugo Pasini, Eduardo Borges, Luiz Ramalho, Luiz Tangerino e tantos outros, por me receberem tão bem e proporcionarem ambiente favorável para que eu pudesse criar raízes e me desenvolver em uma cidade onde, a princípio, estava sozinho.

Ao UIRAPURU SUPERIOR, nas pessoas da Prof^a Maura Maria Bolfer e Sr. Arthur Fonseca Filho, por acolherem minha indicação, realizada por meio do Prof. Marcelo Conte e investirem na minha carreira, proporcionando oportunidade e suporte para concluir essa etapa.

A professora Cláudia Regina Cavagliéri, por poucas, mas sabias e essenciais palavras, as quais me transmitiram confiança, fé e força para trilhar os passos finais dessa etapa, bem como pelo conhecimento transmitido durante a disciplina de Imunologia no programa de pós-graduação.

Aos professores Cláudio Alexandre Gobatto e Fúlvia Manchado Gobatto pelo auxílio na condução de todo o projeto.

A professora Silvana Bordin, pelas orientações técnicas e por disponibilizar, com tamanho desprendimento, o laboratório que coordena no Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo (ICB-USP) para que pudesse desenvolver meus experimentos.

Aos alunos do ICB-USP, Luciana, Zé Edgar, Gabriel, Carla, Camilo e Tatiana, por toda a paciência e ajuda nos procedimentos laboratoriais. Ajuda que certamente foi fundamental para o andamento do trabalho.

A todos os professores do período de graduação, por plantarem a semente do estudo e do conhecimento em meu peito.

A agência de fomento para o desenvolvimento da pesquisa FAPESP (Fundo de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo) e ao FAP (Fundo de Apoio a Pesquisa da UNIMEP).

Em fim, a todas as pessoas que passaram pela minha vida durante todo esse período. Certamente todos, sem exceção, tiveram alguma participação na realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	i
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	iv
LISTA DE ANEXOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Lactato como metabólico da contração muscular.....	5
2.2. Transportadores de Lactato.....	15
2.3. Identificação e Caracterização da Família dos MCT's.....	18
2.3.1. MCT1.....	18
2.3.2. MCT2.....	20
2.3.3. MCT3 e MCT4.....	21
2.3.4. MCT5, 6 e 7.....	23
2.3.5. Outros Membros da Família MCT.....	24
2.3.6. MCT Mitocondrial.....	25
2.4. Características Gerais dos MCT's.....	28
2.5. Propriedades Gerais do Transporte de Lactato Via MCT's.....	29
2.6. Isoformas mais Encontradas no Músculo Esquelético.....	31
2.7. Expressão dos MCT's no Músculo Esquelético frente ao Exercício Físico....	36
2.8. Máxima Fase Estável do Lactato.....	44
3 - OBJETIVOS	48
3.1. Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivo Específico.....	48
4 - METODOLOGIA	49
4.1. Animais.....	49
4.2. Protocolo Experimental.....	49
4.2.1. Adaptação dos Animais ao Meio Líquido.....	49
4.2.2. Determinação da Máxima Fase Estável de Lactato em Exercício Contínuo.....	50
4.2.3. Sessão Aguda de Exercício em Meio Líquido.....	51
4.3. Obtenção dos Tecidos.....	51
4.4. Avaliação da Expressão Gênica dos MCT's 1 e 4.....	51
4.4.1. Desenho das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores.....	52
4.4.2. Extração do RNA Total.....	53
4.4.3. Quantificação do RNA Total Extraído.....	53
4.4.4. Verificação da Integridade do RNA Extraído.....	54
4.4.5. Síntese de cDNA – Reação de Transcrição Reversa (RT)	55

4.4.6. Processamento da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).....	56
4.4.7. Padronização do Número de Ciclos da Reação em Cadeia pela Polimerase para os Genes em Estudo.....	57
4.5. Análise Estatística.....	58
5 – RESULTADOS.....	60
5.1. Determinação da MFEL.....	60
5.2. Expressão do Gene MCT1 em Diferentes Tecidos de Camundongos após Sessão de Natação na Máxima Fase Estável do Lactato.....	62
5.3. Expressão do Gene MCT4 em Diferentes Tecidos de Camundongos após Sessão de Natação na Máxima Fase Estável do Lactato.....	64
6 – DISCUSSÃO.....	66
7 – CONCLUSÃO.....	71
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
9 – ANEXOS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAT	: Alanina Amino Transferase
Ac	: Acetoacetato
A-CoA	: Acetil coenzima-A
ADP	: Adenosina Difosfato
AMP	: Adenosina Monofosfato
Antisense	: Sentido 5' - 3' da fita do DNA
ATP	: Adenosina trifosfato
cDNA	: Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CHC	: α -cyano-4-hidroxiacinamato
CHO	: Carboidrato
CO₂	: Gás Carbônico
COX	: Citocromo Oxidase
CS	: Citrato Sintase
CTE	: Cadeia de Transportes de Elétrons
DEPC	: Dietilpirocarbonato (inibidor de RNAses)
DNA	: Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	: Deoxirribonucleotídeos
DTT	: Ditioneitol
EDL	: Músculo Extensor Longo dos dedos
EDTA	: Ácido etilenodiaminotetracético
FABP	: Proteína Ligadora de Ácidos Graxos
FAD⁺	: Flavina Adenina Dinucleotídeo Oxidada

FAT	: Ácido graxo translocase
G	: Glicose
Glc-1-P	: Glicose 1-fosfato
Glc-6-P	: Glicose 6-fosfato
GLUT4	: Transportador de Glicose 4
H⁺	: Íon de Hidrogênio
HBDH	: Glicerol-3-fosfato Desidrogenase
HCL	: Ácido Clorídrico
HK	: Hexoquinase
iPO₂	: Pressão Intracelular de Oxigênio
KCL	: Cloreto de Potássio
<i>K_m</i>	: Constante de Michaelis
LDH	: Enzima lactato desidrogenase
MCT	: Transportador de elementos monocarboxilados (Monocarboxylate Transporters)
MFEL	: Máxima Fase Estável do Lactato
MgCl	: Cloreto de Magnésio
mLDH	: Lactato Desidrogenase Mitocondrial
MOPS	: 3- ácido propanesulfônico
mRNA	: Ácido Ribonucleico Mensageiro
Na⁺	: íon de Sódio
NAD⁺	: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidada
NH₄	: Hidróxido de Amônia
NHE1	: Transportador de Sódio dependente de H ⁺ (Na ⁺ /H ⁺ Exchange1)

O₂	: Oxigênio
PC	: Peso Corporal
PCr	: Creatina Fosfato
PCR	: Reação em Cadeia pela Polimerase
PDH	: Piruvato Desidrogenase
PFK	: Fosfofrutoquinase
pH	: Potencial Hidrogeniônico
PHOS	: Glicogênio Fosforilase
Pi	: Fosfato Inorgânico
Primer	: Oligonucleotídeo iniciador
PVC	: Poli Cloreto de Vinila
RNA	: Ácido Ribonucléico
SDH	: Succinato Desidrogenase
Sense	: Sentido 3' - 5' da fita do DNA
SO₄	: Sulfato
SS	: Lançadeiras malato-aspartato e alfa-glicerofosfato
TM	: Segmento Transmembrana
TRIS	: Tri (hidroximetil) – aminometano
V_{max}	: Taxa Máxima de Transporte
VO_{2Máx}	: Consumo Máximo de Oxigênio
β-HB	: β-hidroxibutirato

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática global da via metabólica glicólise anaeróbica: Série de 10 reações enzimáticas que findam com a ressíntese de 2 moléculas de ATP, a redução de 2 co-enzimas NAD^+ à NADH, e a formação de 2 moléculas de piruvato (McARDLE et al., 2003)..... p.6.

Figura 2. Esquematização da via glicolítica com ênfase nas principais enzimas que regulam essa via; na transferência dos redutores oriundos da fase anaeróbia da glicólise para a mitocôndria através das lançadeiras específicas; e na transferência desses agentes para o piruvato por meio da ação da enzima LDH gerando o lactato. A linha vertical indica a membrana plasmática. O retângulo representa a mitocôndria. G: glicose; L: lactato; A-CoA: acetil coenzima A; PHOS: glicogênio fosforilase; HK: hexoquinase; PFK: Fosfofrutoquinase; SS: sistema de lançadeira malato-aspartato; LDH: Lactato desidrogenase; AAT: alanina amino transferase; PDH: piruvato desidrogenase.p.9.

Figura 3. Esquema representativo dos processos envolvidos na hipótese das lançadeiras de lactato de acordo com Brooks, 1996. (1) A Glicose entra na célula por transportadores específicos e sofre reações que a convertem em piruvato; (2) O Piruvato entra na mitocôndria e é oxidado no ciclo do ácido cítrico (TCA) (3); (4) Quando essa via satura, a LDH reduz o piruvato a lactato; (5) O lactato pode ser removido da célula ou enviado diretamente para dentro da mitocôndria por transportadores específicos; (6) Quando o lactato entra na mitocôndria ele sofre ação da mLDH (Lactato desidrogenase mitocôndria) que o oxida novamente em piruvato; (7) Proposta da lançadeira intracelular de lactato (PHILP et al. 2005). p.16.

Figura 4. Esquema gráfico das vias metabólicas que necessitam de transporte de elementos monocarboxilados através das membranas mitocôndrial e plasmática. As siglas, Glc-1-P e Glc-6-P, significam Glicose 1-fosfato e glicose 6-fosfato respectivamente; Ac representa acetoacetato; e β -HB representa β -hidroxibutirato (HALESTRAP & PRICE, 1999). p.18.

Figura 5. Mapa cromossômico do lócus do SLC16A1 humano. SCH representa a localização do gene humano do MCT1, 1p13.2-p12 coromossomo 1 (GARCIA et al., 1994). p.20.

Figura 6. Northern Blot da distribuição das isoformas de MCT em diferentes tecidos humanos. No músculo esquelético as isoforma 1 e 4 são as mais encontradas. O MCT2 é pouco expresso em humanos. O MCT5 é fortemente expresso nos rins, apesar de ser encontrado em menor escala na próstata, nos músculos e na placenta. O MCT6 é expresso no coração, músculos esqueléticos e fígado. Por fim, o MCT7 é expresso no cólon, intestino, ovário, próstata, Timo, pâncreas, fígado, pulmão, cérebro e coração (PRICE et al., 1998). p.23.

Figura 7. Ilustração do funcionamento do transporte intracelular de lactato (GLADDEN, 2004). A glicose é degradada a piruvato, esse pode ser transportado para a mitocôndria, o que acontece via MCT1 com acoplamento de H^+ , ou ser reduzido à Lactato. Esse último pode ser transportado até a membrana pelo mesmo sistema, por meio de MCT1 e acoplado a um H^+ . Dentro da mitocôndria a mLDH age sobre o lactato oxidando-o novamente à piruvato, que será oxidado no ciclo do ácido cítrico. Os agentes redutores produzidos pela glicólise na sua fase anaeróbia são transferidos, durante todo o processo, para dentro da mitocôndria e encaminhados para a CTE por meio de lançadeiras específicas (malato-aspartato) ou acoplados ao MCT1 durante o transporte de piruvato ou lactato. LDH, Lactato Desidrogenase; LDH*, Lactato Desidrogenase Mitocôndria; PYR, Piruvato; TCA, Ciclo do ácido cítrico; ETC. Cadeia de transporte de elétrons; SHUTLES, SS lançadeira malato-aspartato. p.26.

Figura 8. Ilustração do complexo mitocôndrial de oxidação do lactato. Lactato é oxidado em piruvato via mLDH em associação com a COX. O transporte de piruvato através da membrana interna da mitocôndria é facilitado pelo MCT1. GP: Glicerol Fosfato; Mal-Asp: Malato – Aspartato; ETC: Cadeia de transporte de elétrons; TCA: Ciclo do ácido cítrico. (HASHIMOTO et al, 2006)..... p.27.

Figura 9. Proposta de tipologia do MCT1 (POLLE et al, 1996). De modo geral, os MCT's possuem entre 10 e 12 segmentos transmembrana (TM) alfa-helicoidal, com as terminações N e C intracelulares e um grande *loop* intracelular entre os segmentos 6 e 7. Essas características são comuns a todos os membros da família de transportadores. As metades N e C terminais da proteína transportadora possuem características diferentes. A metade N-terminal (hélices 1-6) tem um nível mais alto de conservação do que a metade C-terminal (hélices 7-12), o que propõe que a terminação N esteja associada ao acoplamento energético (via H⁺ ou Sódio) e o setor C-terminal é determinante na seleção do substrato alvo. O *loop* intracelular entre os segmentos 6-7 pode variar sensivelmente entre os membros da família..... p.28.

Figura 10. Representação esquemática da cinética de transporte do MCT1. Taxas constantes determinam o transporte para dentro ou para fora da membrana plasmática de diferentes substâncias monocarboxiladas. O equilíbrio entre as concentrações emperra o sistema (JUEL & HALESTRAP, 1999)..... p.30.

Figura 11. Foto digitalizada do gel de agarose 1,2% desnaturante (formaldeído 37%) após separação eletroforética do RNA total extraído a partir do coração e da porção vermelha do músculo gastrocnêmico, utilizando o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Linhas 1 e 2 RNA extraído do coração ; e Linhas 3 e 4 RNA extraído da porção vermelha do gastrocnêmio..... p.54.

Figura 12. Foto digitalizada do gel de agarose 1,5% após separação eletroforética do do cDNA obtido a partir do RNA total dos tecidos analisados. Linha 1 Coração; Linha 2 Fígado; Linha 3 porção vermelha do gastrocnêmio; Linha 4 porção branca do músculo gastrocnêmio; Linha 5 músculo bíceps..... p.55.

Figura 13. Determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL) em camundongos submetidos aleatoriamente em 5 cargas de nado determinadas pelo percentual do peso corporal (3, 4, 5, 6 e 7%). A MFEL foi considerada a mais alta intensidade na qual se obteve estabilização lactacidêmica. Valores expressos em média e \pm erro padrão da média n=26..... p. 61.

Figura 14. Determinação da expressão gênica do MCT1 em diferentes tecidos. a) Coração; b) Fígado; c) Gastrocnêmico porção vermelha; d) Gastrocnêmico porção branca; e) Sóleo; e f) Bíceps de camundongos submetidos a exercício de natação na máxima fase estável do lactato. Os dados representam a média e o desvio padrão de dois experimentos em duplicata de cada grupo específico com n de 6 animais. O símbolo * indica $p < 0,05$ entre os grupos indicados..... p.63.

Figura 15. Determinação da expressão gênica do MCT4 em diferentes tecidos. a) Coração; b) Fígado; c) Gastrocnêmico porção vermelha; d) Gastrocnêmico porção branca; e) Sóleo; e f) Bíceps de camundongos submetidos a exercício de natação na máxima fase estável do lactato. Os dados representam a média e o desvio padrão de dois experimentos em duplicata de cada grupo específico com n de 6 animais. O símbolo * indica $p < 0,05$ entre os grupos indicados. p.65.

Tabela 1: Sequências sense e antisense dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos a serem obtidos e temperatura de anelamento.p.52.

Tabela 2: Condições padronizadas para avaliação da expressão gênica dos genes de estudo em tecidos de camundongos.p.58.

Tabela 3: Lactacidemia expressa em média e erro padrão(\pm) dos camundongos nos períodos antes e durante (5, 10, 15, 20 e 25 minutos) do teste de MFEL em diferentes intensidades (Carga - %PC)..... p.60.

Tabela 4: Quantidade de animais que atingiram a MFEL em cada intensidade, expressos em valores absolutos e percentuais e a média da lactacidemia de estabilização. p.61.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Análise densitométrica da RT-PCR e perfil eletroforético dos fragmentos do produto de PCR obtidos em diferentes pontos da amplificação para padronização do número de ciclos de amplificação para o gene MCT1 a partir do RNA total extraído de diferentes tecidos sob temperatura de anelamento de 57,1°C. Em vermelho, o ciclo de escolha para avaliação da expressão gênica. a) Coração, 34 ciclos; b) Fígado, 32 ciclos; c) Porção vermelha do gastrocnêmio, 34 ciclos; d) Porção branca do gastrocnêmio, 35 ciclos; e) Sóleo, 37 ciclos; e f) Bíceps, 35 ciclos..... p.91.

Anexo 2. Análise densitométrica da RT-PCR e perfil eletroforético dos fragmentos do produto de PCR obtidos em diferentes pontos da amplificação para padronização do número de ciclos de amplificação para o gene MCT4 a partir do RNA total extraído de diferentes tecidos sob temperatura de anelamento de 58,2°C. Em vermelho, o ciclo de escolha para avaliação da expressão gênica. a) Coração, 34 ciclos; b) Fígado, 37 ciclos; c) Porção vermelha do gastrocnêmio, 34 ciclos; d) Porção branca do gastrocnêmio, 34 ciclos; e) Sóleo, 37 ciclos; e f) Bíceps, 34 ciclos..... p.92.

Anexo 3. Análise densitométrica da RT-PCR e perfil eletroforético dos fragmentos do produto de PCR obtidos em diferentes pontos da amplificação para padronização do número de ciclos de amplificação para o gene β -actina a partir do RNA total extraído de diferentes tecidos sob temperatura de anelamento de 58,2°C. Em vermelho, o ciclo de escolha para avaliação da expressão gênica. a) Coração, 30 ciclos; b) Fígado, 34 ciclos; c) Porção vermelha do gastrocnêmio, 32 ciclos; d) Porção branca do gastrocnêmio, 32 ciclos; e) Sóleo, 34 ciclos; e f) Bíceps, 34 ciclos..... p.93.

RESUMO

O lactato é um importante metabólito intermediário energético produzido constantemente pelas células. Contudo, sua produção é preponderante em situações de alta demanda energética. Atualmente, esse metabólito é compreendido como elemento chave em um mecanismo importante de compartilhamento de substrato energético, uma vez que diferentes tecidos podem compartilhar de uma mesma fonte energética por meio de oxidação ou gliconeogênese. Assim, os mecanismos de transporte desse metabólito podem interferir diretamente em sua concentração plasmática no período entre sua produção e consumo. Nossa hipótese é que o aumento na concentração de lactato induzida pelo exercício possa promover aumento na expressão gênica dessas proteínas em tecidos inativos durante o exercício, promovendo maior capacidade de manter a lactacidemia durante exercícios em intensidades equivalentes à máxima fase estável do lactato (MFEL), por aumentar a participação dos músculos inativos na remoção do lactato sanguíneo. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão gênica dos transportadores MCT1 e MCT4 em tecidos ativos e inativos, bem como nos órgãos coração (COR) e fígado (FIG) de camundongos em resposta à uma única sessão de natação em intensidade equivalente a MFEL. Inicialmente, 24 camundongos tiveram avaliadas, individualmente, a intensidade equivalente a MFEL no exercício de natação. Em seguida, todos os animais foram submetidos à sessão de exercício de natação na intensidade referente à MFEL durante 25 minutos ou até exaustão. Após a sessão aguda de exercício, os animais foram divididos em 3 grupos e sacrificados nos períodos imediatamente (n=6); 5 horas (n=6); e 10 horas (n=6) após a sessão de exercício. Como controle foram utilizados animais (n=6) com a mesma característica, exceto pelo fato de não terem realizado a sessão de exercício de natação. Os músculos sóleo (SOL), as porções branca (GB) e vermelha (GV) do gastrocnêmio e o bíceps (BIC), considerado músculo inativo, foram obtidos, assim como o FIG e o COR. A expressão gênica foi determinada pela técnica semi-quantitativa RT-PCR. Como tratamento estatístico foi utilizado ANOVA com post-hoc de *Tukey* interpretado a 95% ($p < 0,05$). A determinação da MFEL em camundongos durante o exercício de natação mostrou que os valores lactacidêmicos ficam em torno de 5,5mmol/L de lactato. Com relação ao MCT1, observou-se aumento significativo da EG no FIG (39%) 10 horas após o exercício. No GB observou-se pico de expressão imediatamente após o exercício (62,3%). No SOL a expressão aumentou imediatamente após o exercício (202,1%) e se manteve elevada até 10 horas após (227,3% e 230%, 5 e 10 horas após o exercício respectivamente). Nos tecidos COR, BIC e GV não foram encontradas alterações relevantes na EG do MCT1. Já em relação ao MCT4, observou-se redução significativa da EG no coração em todos os momentos em relação ao controle (-28,2%; -35,5% e -38,3%, imediatamente, 5 e 10 horas após o exercício respectivamente) e aumento na EG imediatamente e 10 h após no SOL (82% e 55,9% respectivamente). Nota-se que a cinética de EG do MCT1 em tecidos consumidores de lactato ocorre tardiamente, após 10 h. Já em relação a EG do MCT4, o exercício proposto parece não promover alteração nos tecidos FIG, GB, GV e BIC. Vale destacar ainda que em tecidos ativos, o exercício com predominância aeróbia promove adaptações agudas na EG do MCT1 tanto em tecidos com predominância de fibras tipo I quanto em tecidos com predominância de fibras tipo II. Entretanto, nenhuma alteração foi identificada no BIC, tecido inativo durante o exercício proposto. Assim, conclui-se com esse estudo, que a concentração de lactato obtida durante o exercício moderado em intensidade de MFEL não promoveu aumento significativo na expressão de MCT1 e MCT4 na musculatura pouca ativa do bíceps e que a manutenção da lactacidemia nessa intensidade de esforço pode ser controlada principalmente pela ação dos MCT1 no músculo sóleo e no coração.

Palavras Chave: MCT; Expressão Gênica; Exercício; Natação; Máxima Fase Estável do Lactato

ABSTRACT

Lactate is an important energy intermediate metabolic produced constantly for the cells. However, its production is preponderant in situations of high energy demand. Currently, the lactate is understood as element key in an important mechanism of energy substratum sharing, a time that different tissues can share of one same energy source by means of oxidation or gluconeogenesis. Thus, the mechanisms of transport of this element can directly intervene with its plasma concentration in the period between its production and consumption. Our hypothesis is that the increase in the induced lactate concentration for the exercise can promote increase in the gene expression (GE) of these proteins in inactive muscles during the exercise, promoting bigger capacity to keep the lactate concentration during exercises in intensities equivalent to the maximal lactate steady state (MLSS), for increasing the participation of the inactive muscles in the removal of sanguineous lactate. The objective of the present study was to evaluate the GE of transporters MCT1 and MCT4 in active and inactive muscles, as well in the heart (HER) and liver (LIV) of mice in reply to the one only session of swimming in intensity equivalent the MLSS. Initially, 24 mice had evaluated, individually, the intensity equivalent the MLSS in the swimming exercise. After that, all the animals had been submitted to the session of exercise of swimming in the referring intensity to the MLSS during 25 min or until exhaustion. After the session of exercise, the animals had been divided in 3 groups and sacrificed in the periods immediately (n=6); 5 hours (n=6); e 10 hours (n=6) after the exercise session. As it has controlled had been used animal (n=6) with the same characteristic, except for the fact not having carried through the session of swimming exercise. The muscles sóleo (SOL), the portions white (GB) and red (GR) of the gastrocnemius and the biceps (BIC), considered inactive muscle, had been gotten, as well as the LIV and the HER. The GE was evaluated by RT-PCR. As statistical treatment it was used ANOVA with post-hoc of Tukey interpreted was 95% (<0,05). The determination of the MLSS in mice during the swimming exercise showed that the lactate plasma concentration values are around 5,5mmol/L. With regard to the MCT1, significant increase of the EG in the LIV was observed after (39%) 10 hours the exercise. In the GW expression peak was observed immediately after the exercise (62.3%). In the SOL the expression increased after the exercise immediately (202.1%) and if kept after high up to 10 hours (227.3% and 230%, 5 and 10 hours after the exercise respectively). In HER, BIC and GR had not been found alterations in the EG of the MCT1. Already in relation to the MCT4, significant reduction of the EG in the HER in all was observed the moments in relation to control (- 28.2%; -35,5% and -38,3%, immediately, 5 and 10 hours after the exercise respectively) and increase in EG immediately and 10hours after in the SOL (82% and 55.9% respectively). The kinetic of EG of the MCT1 in consuming lactate tissue occurs delayed 10 h. Already in relation the EG of the MCT4, the considered exercise seem not to promote alteration in LIV, GW, GR and BIC. Valley to detach despite in active tissue, the exercise with aerobic predominance in such a way promotes acute adaptations in the EG of the MCT1 in muscles with staple fiber predominance type I how much in muscles with staple fiber predominance type II. However, no alteration was identified in the BIC, weaveeed inactive during the considered exercise. Thus, it is concluded with this study, that the lactate concentration gotten during the moderate exercise in MSLL intensity did not promote significant increase in the GE of MCT1 and MCT4 in the muscle little active of the BIC and that the maintenance of the lactate concentration in this intensity of effort can mainly be controlled for the action of the MCT1 in the SOL muscle and the HER.

Key Word : MCT; Gene Expression; Exercise, Swimming, Maximal Lactate Steady State

1. INTRODUÇÃO

O lactato é um metabólito consagrado como produto final da fase anaeróbica da glicólise e conhecido do público em geral como substância que se acumula na musculatura ou na corrente sanguínea durante exercícios anaeróbicos, de alta intensidade, que promovem situações de hipóxia, além de ter sido identificado por muitas décadas como principal indutor da fadiga.

De fato, inúmeras pesquisas históricas demonstram a relação direta entre a instalação da fadiga e a concentração de lactato plasmático.

Entretanto, mais recentemente, muitos estudos têm sido realizados no sentido de elucidar as reais condições de produção e funções do lactato.

Um dos principais achados a respeito das funções do lactato é que ele pode ser utilizado como fonte energética em tecidos que, durante a realização de um dado exercício, estão sob condições de estresse menores ou em repouso, como por exemplo, os músculos menos ativos durante o exercício, o coração, o fígado e o cérebro.

Nesse sentido, o lactato passa a ser compreendido como um metabólito chave para um mecanismo importante de compartilhamento de substrato energético, uma vez que diferentes tecidos podem compartilhar de uma mesma fonte energética por meio da oxidação e outros processos tais como o processo de gliconeogênese, ou seja, os átomos de carbono presentes na molécula de lactato poderiam ser utilizados como fonte energética em diferentes células do organismo. Desta forma, definindo o lactato como elemento integrante dos processos orgânicos de produção de energia e não apenas um produto final da via glicolítica.

O lactato realiza armazenamento temporário de H^+ e é um metabólito precursor de glicogênio nos hepatócitos, tais condições oferecem oportunidade para manutenção sustentada de ressíntese de ATP em diversos tecidos e diferentes situações de demanda energética.

Além disso, alguns estudos apontam uma função sinalizadora do lactato, a ponto de ter sido chamado por Brooks (2002) como pseudo-hormônio, por estar relacionado com o estímulo a ações regenerativas (anabólicas) (TRABOLD et al., 2003), ao aumento da atividade de fibroblastos (GREEN et al., 1964) e ao aumento do fator de crescimento endotelial (VEGF)

(CONSTANT et al., 2000; TRABOLD et al., 2003), o que aumenta a lista de funções integrativas do lactato.

Entretanto, para que o lactato possa ter essa função integradora é necessário um sistema de transporte através da membrana plasmática adequado.

Nesse sentido, uma série de trabalhos empregando técnicas moleculares (clonagem e sequenciamento de DNA) e sequenciamento de proteínas, realizados a partir da década de 90, findaram por concluir que, de fato, existe um sistema protéico de transporte de lactato e outras substâncias carboxiladas, e que essas proteínas são encontradas em diversos tecidos.

Dessa forma, definiu-se que tanto o lactato quanto outros elementos monocarboxilados atravessam a membrana plasmática por meio de um sistema de transporte protéico saturável e específico, o qual recebeu o nome de *monocarboxylate transporters* (MCT's).

Existe uma grande variedade de isoformas de MCT, entretanto, com relação ao metabolismo do lactato durante o exercício destacam-se as isoformas MCT1 e o MCT4.

O MCT1 está presente em grande parte dos tecidos orgânicos, principalmente no tecido muscular (fibras oxidativas) e no coração, e está relacionado à entrada do lactato na célula. Enquanto que o MCT4 é encontrado principalmente no tecido muscular (fibras brancas de contração rápida) e está relacionado à saída de lactato da célula para o sangue. Tais proteínas possuem papel central no metabolismo da glicose e na comunicação entre células e tecidos. Promovendo transporte adequado ao lactato, permitem que esse integre o metabolismo energético glicolítico e oxidativo, bem como, promova substrato para gliconeogênese e lipogênese.

Mais tarde, após a identificação da existência de proteínas transportadoras de elementos carboxilados, alguns estudos passaram a identificar a existência da relação entre alterações no transporte de lactato induzidas por atividade crônica dos músculos e a modulação da expressão dessas proteínas transportadoras.

Em conclusão a esses estudos, nota-se que muitos resultados divergentes são encontrados quando se investiga a resposta da expressão desses transportadores frente ao exercício físico. De fato, a grande

variabilidade de métodos e intensidades de treinamento contribui para que respostas diferentes sejam observadas.

Contudo, percebe-se que as fibras de contração lenta possuem uma maior responsividade em relação ao exercício quando se trata da expressão dessas proteínas, com destaque para o MCT1. Nota-se também que exercícios de alta intensidade, mas que permitam uma relativa manutenção do pH são mais efetivos na estimulação da expressão dessas proteínas, bem como, a quantidade desses transportadores interfere diretamente no desempenho durante o exercício e no tempo de recuperação.

Fica claro ainda que o lactato é capaz de movimentar-se entre diferentes compartimentos celulares, fibras, tecidos (mais ou menos ativos) e órgãos, devido a presença de diversas isoformas de MCT. Assim sendo, a presença dos MCT's no tecido muscular se configura em aspecto fundamental para a manutenção e ou remoção do lactato sanguíneo durante e após o exercício.

Frente a essa constatação e visto que existe a hipótese de que o lactato tenha função sinalizadora no organismo, sugere-se que também possa induzir alterações na expressão de seus transportadores em músculos menos ativos ou mesmo inativos durante uma determinada ação física, o que certamente determinaria a condição da concentração de lactato e conseqüentemente dos indicadores de desempenho relacionados a ela, tais como limiar de lactato e máxima fase estável o lactato (MFEL).

Entretanto, não existem estudos que avaliem o comportamento da expressão gênica dessas proteínas após sessão aguda ou período de treinamento em músculos pouco ou não ativos.

Nossa hipótese é que o aumento da lactacidemia induzida pelo exercício pode promover expressão de MCT's em músculos inativos. Tal resposta explicaria a manutenção da lactacidemia durante exercícios em intensidades mais elevadas, equivalentes à máxima fase estável do lactato, exatamente por aumentar a participação dos músculos inativos na remoção do lactato sanguíneo.

Assim, o objetivo do presente estudo é analisar o efeito de uma sessão aguda de natação em intensidade equivalente à MFEL sobre a regulação gênica das isoformas de MCT 1 e 4 em músculos esqueléticos ativos e inativos

durante a natação, bem como em tecidos consumidores de lactato fígado e coração de camundongos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LACTATO COMO METABÓLITO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR

O lactato é um metabólito consagrado como produto final da fase anaeróbica da glicólise e conhecido do público em geral como substância que se acumula na musculatura ou na corrente sanguínea durante exercícios de alta intensidade, além de ser conhecido como principal indutor da fadiga (FLETCHER & HOPKINS, 1907; COGGAN et al., 1992; MONDERO & DONNE., 2000; VAN PRAAGH & DORÉ, 2002; KRISTENSEN et al., 2005).

Tal raciocínio é justificado, uma vez que, historicamente, inúmeras pesquisas demonstraram a relação direta entre intensidade do exercício e o acúmulo de lactato dentro e fora da célula (FLETCHER & HOPKINS, 1907; ROBERGS et al., 2004; FERGUNSON et al., 2007), bem como, detectam altas concentrações desse metabólito, principalmente no sangue, em situações de exaustão (RAYMER et al., 2004; MARCORA et al., 2008).

Sua produção ocorre na fase final do metabolismo da via glicolítica (glicólise), pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) sob o piruvato, cuja reação enzimática é reversível. Sob condições fisiologicamente desfavoráveis como, por exemplo, diminuição na oferta de oxigênio, observa-se um acúmulo de íons H^+ e piruvato, nessa condição têm se como consequência o acúmulo de lactato (HARGREAVES & THOMPSON, 1999; NELSON & COX, 2000; McARDLE et al., 2003; VOET & VOET, 2006).

Para melhor compreender a formação e o acúmulo do lactato, abaixo tem-se uma breve descrição dos principais eventos metabólicos envolvidos neste processo.

O carboidrato (CHO) é o substrato preterido para ressíntese da Adenosina Trifosfato (ATP) durante o exercício a medida que a intensidade desse aumenta, sua metabolização ocorre em duas fases, citoplasmática (anaeróbica) e mitocôndrial (aeróbica), sendo que em ambas ocorre a ressíntese de ATP. Na fase citoplasmática do metabolismo de uma molécula de glicose ocorre a ressíntese de 2 moléculas de ATP, a redução de 2 coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) à NADH, finalizando com a formação de 2 moléculas de piruvato (HARGREAVES & THOMPSON, 1999;

McARDLE et al., 2003; MURRAY et al., 2006; VOET & VOET, 2006). Na figura 1 temos representado o esquema geral da via glicolítica, iniciando a partir da glicose ou do glicogênio.

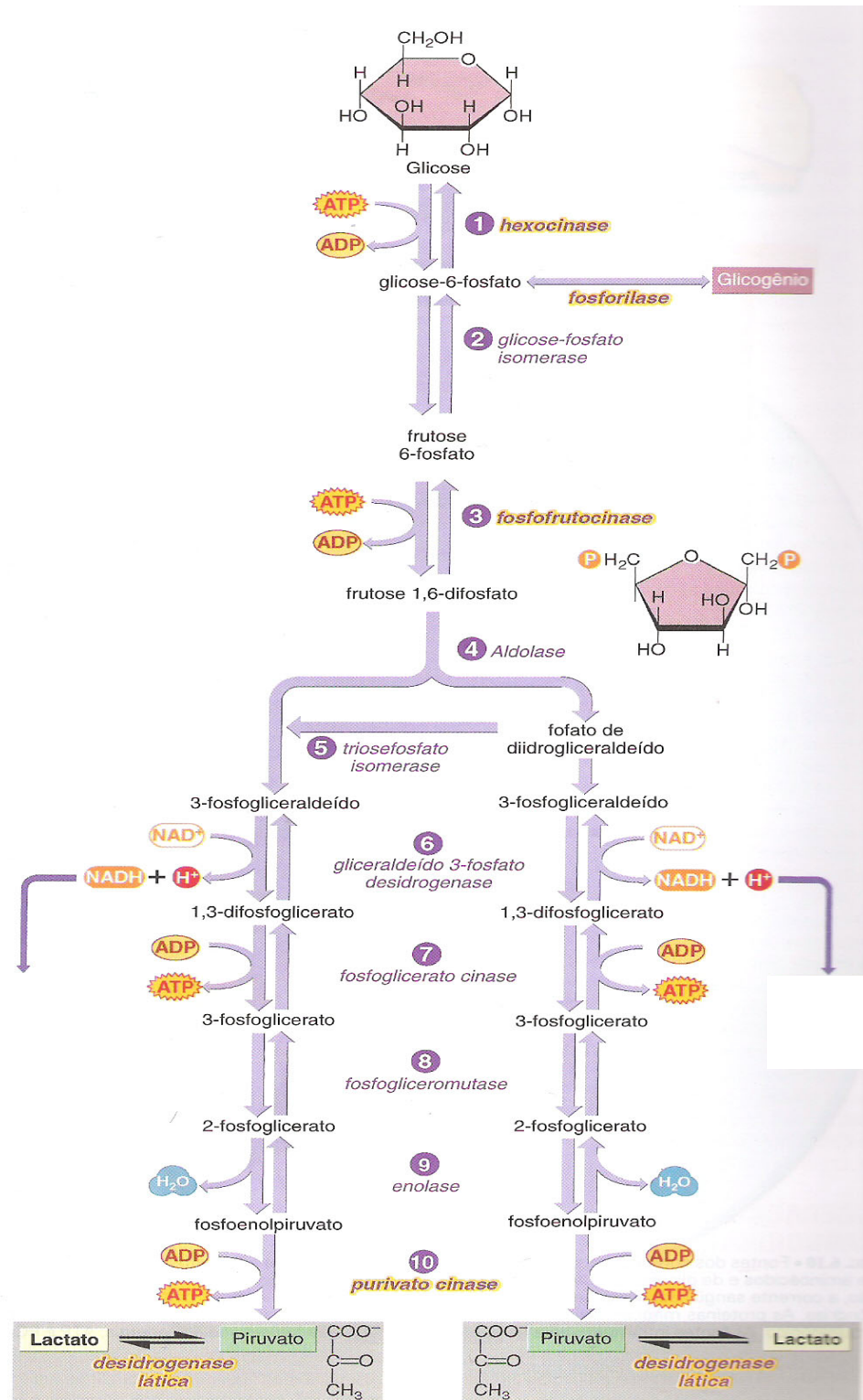


Figura 1. Representação esquemática global da via metabólica glicólise anaeróbica: Série de 10 reações enzimáticas que findam com a ressíntese de 2 moléculas de ATP, a redução de 2 co-enzimas NAD⁺ à NADH, e a formação de 2 moléculas de piruvato (McARDLE et al., 2003).

Quando a glicólise ocorre sob condições normais de captação de oxigênio (O_2) como, por exemplo, em repouso ou durante exercícios de baixa intensidade, o piruvato produzido atravessa a membrana mitocôndrial, e é convertido em acetilCo-A pela ação da enzima Piruvato Desidrogenase (PDH). Desta forma, o piruvato entra no ciclo do ácido cítrico, onde ao longo do processo metabólico irão ocorrer reações de oxido-redução por meio da participação das coenzimas NAD^+ e FAD^+ (Flavina adenina dinucleotídeo), que atuam no transporte de equivalentes redutores (H^+). Estes são lançados no espaço intermembranoso, gerando um gradiente de prótons que culmina com a formação de uma força motriz (complexo V) que atua no processo de re-síntese de ATP, processo denominado de cadeia de transporte de elétrons (CTE) (McARDLE et al., 2003; VOET & VOET, 2006).

De modo similar, os equivalentes redutores produzidos na fase citoplasmática da glicólise também estão envolvidos na re-síntese de ATP, via a força motriz criada no complexo V na CTE, resultante da formação do gradiente de prótons. Porém, a captação deste pela mitocôndria ocorre via lançadeiras específicas, denominadas de malato-aspartato e alpha-glicerofosfato (SS) para posterior oxidação na CTE (HARGREAVES & THOMPSON, 1999; SPRIET et al., 2000; McARDLE et al., 2003; MURRAY et al., 2006; VOET & VOET, 2006).

Contudo, quando a demanda energética excede a capacidade oxidativa da célula como, por exemplo, durante exercícios de alta intensidade, ocorre à aceleração da via glicolítica e as taxas de produção de NADH e piruvato excedem a capacidade da PDH em metabolizar o piruvato e as SS em transferir os equivalentes redutores para a mitocôndria. Assim sendo, a NADH é oxidada em NAD^+ e o piruvato reduzido, gerando a molécula de lactato (SPRIET et al., 2000; VOET & VOET, 2006).

Tal reação é direcionada pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Figura 2) (SPRIET et al., 2000; MURRAY et al., 2006; VOET & VOET, 2006).

Dessa forma, justifica-se o conceito tradicional de que o lactato seria o ponto final da glicólise. De acordo com Gladden (2004), diversos estudos históricos, datados do século 19, demonstraram claramente que as

concentrações de lactato eram proporcionais à ativação dos músculos exercitados, além de sempre estarem associados à privação de O₂.

Philp et al. (2005), acrescentam ainda que a “era” em que o lactato foi considerado o produto final da glicólise se estendeu até meados da década de 70. Nesse período, acreditava-se que o lactato era o primeiro efeito do débito de O₂ e a principal causa da fadiga.

Entretanto, ainda nesse período, algumas pesquisas já apontavam, porém sem clareza, que talvez o lactato não fosse apenas produzido em hipóxia, nem que se tratava simplesmente de substrato final de uma dada via metabólica (FLETCHER & HOPKINS, 1907; CORI et al. 1933; CORI, 1981; BROOKS, 1986_{a,b}; CONNET et al., 1986).

Já em 1907, Fletcher & Hopkins (1907) confirmaram que o lactato surgia em relação à intensidade da contração muscular e na ausência ou deficiência do fornecimento de oxigênio, após investigarem músculos de anfíbios com estimulação *in vitro*. Contudo, observaram também que o lactato desaparecia com o restabelecimento do fluxo de O₂, o que passou a sugerir que o lactato fosse metabolizado, colocando em dúvida os conceitos pré-estabelecidos.

Outro achado desse período que indaga o conceito tradicional do lactato ser um metabólito final da via glicolítica, é a teoria apresentada na década de 30, de que o lactato poderia ser convertido novamente em glicose pelas células hepáticas (CORI et al. 1933; CORI, 1981). Dessa forma, em meados da década de 80, muitos estudos foram conduzidos na tentativa de desvendar se o lactato era, de fato, apenas um metabólito final e apenas produto da hipóxia (BROOKS, 1986_{a,b}; CONNET et al., 1986).

Nessa linha investigativa, Connet et al. (1986) verificaram em músculo canino com estimulação que variou de 10-100% do consumo máximo de O₂, *in vitro*, que músculos com predominância de fibras vermelhas (músculo Grácil) eram capazes de produzir e consumir o lactato quando em situação de equilíbrio no fornecimento de O₂.

Brooks (1986_a) definiu que, de fato, o déficit de O₂ é o fator primordial no acúmulo de lactato, mas outros fatores também poderiam contribuir para sua produção. Ainda de acordo com Brooks (1986_b) em alguns tecidos (por exemplo, o cérebro humano e músculos com predominância de fibras

vermelhas) ocorre à produção de lactato mesmo em situação de aporte adequado de O_2 .

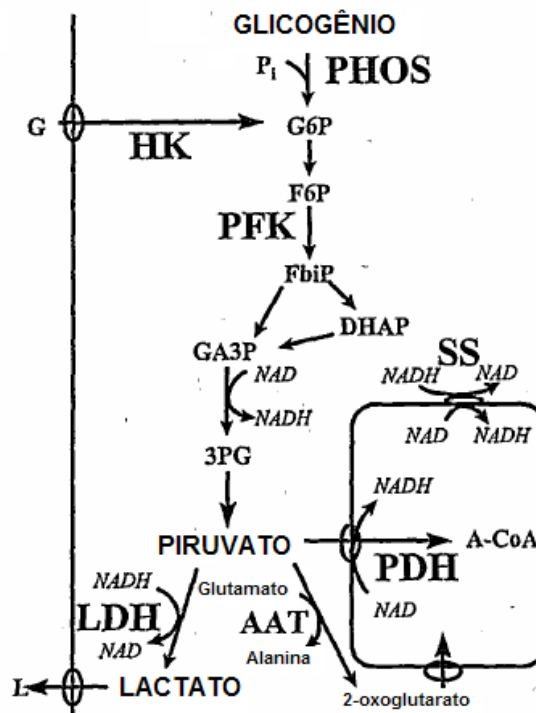


Figura 2. Esquematização da via glicolítica com ênfase nas principais enzimas que regulam essa via; na transferência dos redutores oriundos da fase anaeróbia da glicólise para a mitocôndria através das lançadeiras específicas; e na transferência desses agentes para o piruvato por meio da ação da enzima LDH gerando o lactato. A linha vertical indica a membrana plasmática. O retângulo representa a mitocôndria. G: glicose; L: lactato; A-CoA: acetil coenzima A; PHOS: glicogênio fosforilase; HK: hexoquinase; PFK: Fosfofrutoquinase; SS: sistema de lançadeira malato-aspartato; LDH: Lactato desidrogenase; AAT: alanina amino transferase; PDH: piruvato desidrogenase (SPRIET et al., 2000)

Por meio de estudo que utilizou técnicas de medição arterial e venosa da concentração de lactato, ressonância magnética espectroscópica e saturação de mioglobina, Richardson et al. (1998) investigaram a relação entre a pressão intracelular de O_2 (iPO_2) e a produção de lactato em humanos treinados submetidos a exercício de extensão de joelho em diferentes intensidades (50, 75, 90 e 100% do consumo máximo de $O_2 - VO_{2máx}$). Os resultados obtidos por esses autores indicaram não existir relação entre a iPO_2 e a produção de lactato, contudo, identificaram relação da iPO_2 com o desaparecimento do lactato e a neutralização do pH intracelular.

Em conclusão a estes autores, uma condição anaeróbica parece não ser essencial para que o lactato possa ser produzido, dissociando a idéia de que o lactato ocorre em função apenas da hipóxia (Richardson et al., 1998; Brooks 1986_{a,b}; Connet et al., 1986)

Considerando ainda a relevância da temática, Kemper et al. (2001) verificou a formação de lactato e a taxa de glicólise em situação de hipóxia e de concentrações sustentadas de O_2 em músculo de cobra cascavel. A escolha desse tipo de tecido deve-se primeiramente pelo fato da uniformidade de propriedades das células desse músculo, que permite eliminar o problema de se ter fibras muito heterogêneas no momento de quantificar a glicólise intracelular. Em segundo lugar, esse tecido possui um excepcional sistema de circulação sanguínea, o que permite mensurar diretamente o lactato produzido durante as contrações. Finalmente, o estudo desse tecido é interessante por ter a habilidade de manter-se em atividade por períodos extremamente prolongados.

Os dados produzidos nessa pesquisa demonstraram não existir relação entre a taxa de glicólise e a concentração de O_2 , e que a alta produção de H^+ , de lactato e de outros metabólitos que podem induzir a fadiga, não levam ao desequilíbrio metabólico devido ao alto fluxo sanguíneo da musculatura estudada. Tais achados refutam a hipótese de que a glicólise e conseqüente formação de lactato reflete, necessariamente, uma condição de déficit de O_2 , além de demonstrarem que a glicólise pode fornecer uma fonte sustentável de alta taxa de ressíntese de ATP.

Assim, a formação do lactato e sua transferência para a corrente sanguínea sob circunstâncias inteiramente aeróbicas (no repouso e no exercício) representam um mecanismo importante, uma vez que diferentes tecidos podem compartilhar de uma mesma fonte energética por meio da oxidação e outros processos, tais como o processo de gliconeogênese, ou seja, os átomos de carbono presentes na molécula de lactato poderiam ser utilizados como fonte energética em diferentes células do organismo. Desta forma, definindo o lactato como elemento integrante dos processos orgânicos de produção de energia e não apenas um produto final da via glicolítica. (BROOKS, 1986_b).

De fato, a importância do lactato como intermediário energético, fonte de energia oriunda da glicose, deu-se após estudos que verificavam que durante exercícios de intensidade moderada, o fluxo sanguíneo de lactato excedia o fluxo sanguíneo de glicose (BROOKS, 2000).

Devido sua grande massa e capacidade metabólica, o tecido muscular esquelético se configura no maior produtor de lactato. Entretanto, esse tecido também desempenha papel fundamental na remoção do lactato sanguíneo, uma vez que, além de maior produtor, também é o maior consumidor desse metabólito (GLADDEN, 1998; BROOKS, 1998, BROOKS, 2000, PHILP et al., 2005).

Sabe-se que durante o exercício a produção de lactato, bem como sua liberação para o sangue estão aumentadas. Contudo, a relação entre a produção e a remoção está diretamente relacionada com o tipo e a intensidade do exercício (MARCORA et al., 2008; CATHCART et al., 2008; TRAPP et al., 2007). Por outro lado, em repouso, o lactato produzido pelos músculos esqueléticos é rapidamente transportado para o sangue e a captação desse por parte dos músculos é pequena (BROOKS, 1986_a; GLADDEN 2000; BROOKS, 2000).

Durante exercícios de alta intensidade e curta duração, os músculos produzem lactato rapidamente, sob essa condição verifica-se a formação de um gradiente positivo do lactato no músculo quando comparado com a corrente sanguínea, o que pode resultar em alta concentração intracelular de lactato. Sob esse quadro, a recuperação do lactato sanguíneo para o tecido muscular ocorre, mas em pequena escala se comparada à sua taxa de produção e liberação para a corrente sanguínea (BROOKS, 1986_{a,b}; GLADDEN 1998; BROOKS, 2000; GLADDEN, 2004; BROOKS, 2007).

Contudo, diversos estudos indicam a possibilidade de que após a atividade, durante o repouso, ou mesmo durante atividades em intensidade leve ou moderada de longa duração, pode ocorrer a captação do lactato sanguíneo pelos músculos inativos e músculos que estão em atividade leve ou moderada, embora essa hipótese não tenha sido testada diretamente (PILEGAARD et al., 1993; GLADDEN 1998; BROOKS, 2000; BROOKS, 2007).

Em exercícios de longa duração e de leve à moderada intensidade, os músculos ativos liberam lactato na corrente sanguínea no início da atividade e podem, eles mesmos, bem como outros músculos e tecidos, utilizá-lo como fonte energética para oxidação em momentos posteriores da atividade, quando o estado estável de produção e demanda energética for alcançado (GLADDEN 1998; BROOKS, 2000; GLADDEN, 2004; BROOKS, 2007). Dessa forma, a

lactacidemia aumenta no início da atividade e posteriormente regride, mantendo-se estável e, dependendo da intensidade do exercício, aproximando-se dos níveis de repouso (BROOKS, 2000; McARDLE et al, 2003).

Diversos estudos demonstram que os diferentes tipos de fibras musculares estão relacionados com o comportamento de produção/consumo de lactato citado acima. Um mesmo músculo pode, no mesmo momento, apresentar produção e consumo de lactato, produção por parte das fibras de contração rápida (brancas), e consumo (pela oxidação) por parte de suas fibras de contração lenta (vermelhas) (PILEGAARD et al., 1993; JUEL & HALESTRAP, 1999; GLADDEN, 2000; BROOKS, 2000; BROOKS, 2007).

Kelley et al. (2002), conduziram estudo em músculo gastrocnêmio isolado de cães após perfusão sangüínea com concentração de 9mmol/L de lactato, marcado com carbono¹⁴ radioativo, para observar o metabolismo do lactato e do glicogênio em repouso e em contração (estimulação elétrica). Eles observaram que tanto em repouso quanto em atividade, a maior parte do lactato foi utilizado como substrato energético pelas células musculares.

Outros estudos em animais com características fisiológicas similares corroboram tais achados, demonstrando que as células musculares utilizam lactato de natureza exógena, quando perfundido, como substrato para ressíntese de ATP (GLADDEN, 2000; HAMANN, 2001).

Miller et al. (2002) investigaram essa resposta em humanos. Para tanto, indivíduos do sexo masculino ativos fisicamente, foram submetidos a sessões de exercício em cicloergômetro (90 minutos de duração em intensidades correspondentes a 55%VO_{2pico} e 65%VO_{2pico}) e infundidos com 4mmol/L de lactato, por meio da veia braquial no decorrer do exercício. Ao comparar as sessões de exercício com infusão e em relação à situação controle (exercício sem infusão), notaram uma relação inversa entre a oxidação de lactato e a diminuição da glicose, ou seja, a oxidação de lactato aumenta enquanto a concentração de glicose diminui. Dados observados em ambas as intensidade de exercício avaliadas. Demonstrando assim que o lactato é um hidrato de carbono útil e muito utilizado pelas células em situações de alta demanda energética.

Estudo de Roef et al. (2003) confirmam tais achados ao investigar humanos durante realização de exercício de baixa intensidade (34%VO_{2pico}) em

cicloergômetro, e acrescentam que a gliconeogênese hepática total a partir do lactato aumenta quando da presença de altas concentrações de lactato, bem como, a presença de lactato preserva a glicose sanguínea, mostrando a função poupadora de glicose e o papel de precursor gliconeogênico do lactato.

Além do tecido muscular esquelético, o coração também é um grande consumidor de lactato. De fato, o coração é mais oxidativo que o mais oxidativo dos músculos esqueléticos, o que torna esse órgão um consumidor ativo de lactato em situações de repouso e exercício (BONEN, 2000; BONEN et al., 2000; GLADDEN, 2004).

Gertz et al. (1988) investigaram o substrato utilizado pelas células cardíacas durante exercício de intensidade leve ($40\%VO_{2Máx}$) em indivíduos treinados. Para tal, utilizaram infusão de lactato marcado com carbono¹⁴ radioativo e identificaram oxidação de praticamente todo o lactato marcado. Assim, pela primeira vez em humanos foi demonstrado o consumo de lactato pelas células cardíacas durante o exercício.

Mais recentemente, Zhou et al. (2006) após investigarem o metabolismo cardíaco por meio de modelos computacionais, demonstraram que os miócitos, em situações de alta demanda energética (por exemplo, durante o exercício), têm preferência em utilizar o lactato como substrato energético.

De fato, anteriormente, Stanley (1991) já havia relatado que a captação e subsequente oxidação do lactato pelas células cardíacas estão diretamente relacionadas com a concentração de lactato no sangue.

Durante o exercício físico, a concentração de lactato sanguíneo, o fluxo sanguíneo pelo miocárdio e a demanda energética nesse tecido estão aumentadas. Todos esses fatores modulam a seleção do substrato utilizado pelos miócitos e o lactato passa a ser o substrato energético mais utilizado pelo tecido cardíaco, representando 60% do total de substratos utilizados (STANLEY, 1991).

Estudos empregando moléculas marcadas de lactato, indicam que praticamente todo lactato captado pelo coração é oxidado (GERTZ et al., 1988; STANLEY, 1991; CHATHAM et al., 2001).

Outro tecido consumidor de lactato é o cérebro. Diversos estudos têm demonstrado que o cérebro oxida lactato particularmente durante exercício intenso (DIENEL, 2004; DALSGAARD, 2006; SIMPSON et al., 2007;

BERGERSEN et al., 2002) e continua captando e oxidando lactato até 30 minutos após o esforço (IDE et al., 2000). Entretanto, a captação de lactato por parte desse tecido parece não ser significativa em relação à concentração sanguínea de lactato em todo o corpo durante a realização de exercícios (GLADDEN, 2004). Contudo, alguns estudos recentes têm apontado para a existência de alguma relação entre o fluxo sanguíneo para o cérebro e a captação de lactato no surgimento da fadiga central, mas tal mecanismo ainda não está esclarecido (DALSGAARD, 2006; BERGERSEN, 2007; SECHER, 2008; SIMPSON et al., 2007).

Assim sendo, a produção e remoção de lactato é um processo contínuo, onde o mesmo é produzido e consumido *in loco* ou à distância, por diversos tecidos do corpo, durante o repouso e o exercício.

Devido à grande quantidade de estudos, fica claro que a produção de lactato representa um mecanismo importante para que diferentes tecidos possam compartilhar de uma mesma fonte de energia química.

O lactato realiza armazenamento temporário de H^+ e é um metabólito precursor de glicogênio nos hepatócitos. Tais condições oferecem oportunidade para manutenção sustentada de ressíntese de ATP em diversos tecidos e diferentes situações de demanda energética.

Além disso, alguns estudos apontam uma função sinalizadora do lactato, a ponto de ter sido chamado por Brooks (2002) como pseudo-hormônio, por estar relacionado com o estímulo a ações regenerativas (anabólicas) (TRABOLD et al., 2003), ao aumento da atividade de fibroblastos (GREEN et al., 1964) e ao aumento do fator de crescimento endotelial (VEGF) (CONSTANT et al., 2000; TRABOLD et al., 2003), o que aumenta a lista de funções integrativas do lactato.

Contudo, para que o papel integrador do lactato seja efetivo, faz-se necessário um mecanismo de transporte através da membrana plasmática adequado em todas as células dos diferentes tecidos capazes de metabolizá-lo, até por que, o rápido transporte do lactato através da membrana plasmática é fundamental para o metabolismo celular e importante para manutenção do pH intracelular (POOLE & HALESTRAP, 1993).

Até recentemente, acreditava-se que o lactato produzido era transferido do citosol para o sangue via difusão simples (JUEL & HALESTRAP, 1999;

PHILP et al., 2005; GLADDEN, 2004). Entretanto, Brooks (1986_b) ao analisar os resultados de uma série de estudos, passou a questionar aspectos relacionados ao transporte do lactato e introduziu a hipótese das lançadeiras de lactato (*lactate shuttles*).

2.2. TRANSPORTADORES DE LACTATO

Como foi dito, até recentemente, acreditava-se que o lactato produzido era transferido via difusão simples e que Brooks (1986_b) introduziu a hipótese das lançadeiras de lactato.

A hipótese das lançadeiras de lactato se baseia no fato de que o transporte do lactato pela membrana plasmática ocorre por meio de transporte facilitado e não por difusão simples. Nesse sentido, Brooks (1986_b), autor da hipótese, sugere que o lactato é capaz de ser transferido do seu local de produção para células vizinhas, bem como para uma grande variedade de órgãos, via corrente sanguínea, com o objetivo de ser oxidado ou mesmo servir como substrato para gliconeogênese, por meio de proteínas específicas (Figura 3).

Trabalhos utilizando técnicas de vesículas sarcoplasmáticas gigantes oriundas de células musculares (técnica de cultura de células que permite o isolamento das vesículas celulares para posterior análise) permitiram estudar mais detalhadamente o fluxo de lactato pela membrana plasmática (POOLE & HALESTRAP, 1993; JUEL, 1997; JUEL & HALESTRAP, 1999; BROOKS, 2000), indicando que o transporte de lactato através da membrana plasmática era mediado por um sistema protéico de transporte.

JUEL (1997) chamou a atenção para o fato de que o músculo e muitos outros tecidos possuíam um sistema de transporte de membrana que transportava a molécula de lactato acoplada com um H⁺, além de observar que existem diversas isoformas dessas proteínas e que tais isoformas possuem propriedades e características funcionais específicas que são determinadas pelo tipo de fibra muscular ou do tecido em que estão localizadas.

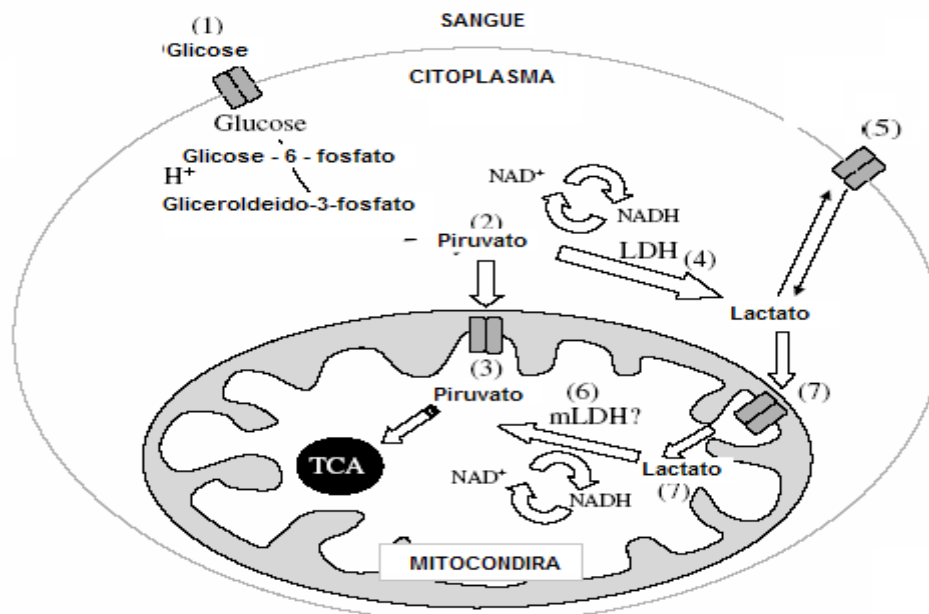


Figura 3. Esquema representativo dos processos envolvidos na hipótese das lançadeiras de lactato de acordo com Brooks (1986). (1) A Glicose entra na célula por transportadores específicos e sofre reações que a convertem em piruvato; (2) O Piruvato entra na mitocôndria e é oxidado no ciclo do ácido cítrico (TCA) (3); (4) Quando essa via satura, a LDH reduz o piruvato a lactato; (5) O lactato pode ser removido da célula ou enviado diretamente para dentro da mitocôndria por transportadores específicos; (6) Quando o lactato entra na mitocôndria ele sofre ação da mLDH (Lactato desidrogenase mitocôndrial) que o oxida novamente em piruvato; (7) Proposta da lançadeira intracelular de lactato. (PHILP et al. 2005).

Nesse sentido, uma série de trabalhos empregando técnicas moleculares (clonagem e sequenciamento de DNA) e sequenciamento de proteínas, realizados a partir da década de 90 findaram por concluir que de fato existe um sistema protéico de transporte de lactato e outras substâncias carboxiladas (piruvato, ácidos graxos de cadeia ramificada, derivados da leucina, valina e isoleucina, corpos cetônicos, β -hidroxibutirato e acetato) no músculo (KIM et al., 1992; GARCIA et al, 1994b; JACKSON et al., 1995; CARPENTER et al., 1996; HALESTRAP et al., 1997).

Ainda nesse período, outros estudos verificaram a presença dessa proteína em diversos tecidos, fora dos músculos esqueléticos (JACKSON et al., 1997; KOEHLER-STECH et al., 1998; GERHART et al., 1998).

Mais tarde, após a identificação da existência de proteínas transportadoras de elementos carboxilados, alguns estudos passaram a identificar a existência de relação entre alterações no transporte de lactato induzidas por atividade crônica dos músculos e a modulação da expressão dessas proteínas transportadoras (BONEN et al., 1997; BONEN et al., 2000a;

DUBOUCHUD et al., 2000; EVERTSEN et al., 2001; TONOUCI et al., 2002; YOSHIDA et al., 2004; COLES et al., 2004; BISHOP et al., 2006; THOMAS et al., 2007).

Tais estudos demonstraram claramente que tanto o lactato quanto outros elementos monocarboxilados, como, piruvato, ácidos graxos de cadeia ramificada derivados da leucina, valina e isoleucina, bem como, corpos cetônicos, β -hidroxibutirato e acetato, atravessam a membrana plasmática por meio de um sistema de transporte protéico saturável e específico, o qual recebeu o nome de *monocarboxylate transporters* (MCT).

Como será discutido adiante, existem diversas isoformas de MCT, cada qual localizada em tecidos específicos e com afinidade por substratos (monocarboxilados) específicos. Entretanto, parece que o mecanismo de transporte ocorre da mesma maneira, independente do substrato transportado ser lactato ou outra substância monocarboxilada. Tal mecanismo de transporte ocorre por meio de acoplamento (1:1) entre uma molécula monocarboxilada e um H^+ ou sódio (dependendo da isoforma) no transportador (JUEL & HALESTRAP, 1999; HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

Estudos com vesículas sarcoplasmáticas animais e humanas indicam que a taxa de transporte do lactato pode variar entre 13 e 40 K_m (constante de Michaelis, K_m) o que indica com precisão a existência de um transportador protéico específico (JUEL & HALESTRAP, 1999; HALESTRAP & PRICE, 1999).

Assim, os MCT's, como são identificadas as diferentes isoformas das proteínas carreadoras de lactato, possuem papel central no metabolismo da glicose e na comunicação entre células e tecidos. Promovendo transporte adequado ao lactato, permitem que esse integre o metabolismo energético glicolítico e oxidativo, bem como, promova substrato para gliconeogênese e lipogênese (Figura 4) (POLLE & HALESTRAP, 1993; PHILP et al., 2005; BROOKS, 2007).

2.3. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FAMÍLIA DOS MCT's

2.3.1. MCT1

Inicialmente, o transporte de lactato foi mais investigado em eritrócitos devido a grande quantidade e facilidade em se obter essas células (POOLE & HALESTRAP, 1992; POOLE & HALESTRAP, 1994; KIN et al., 1992; POOLE & HALESTRAP, 1997).

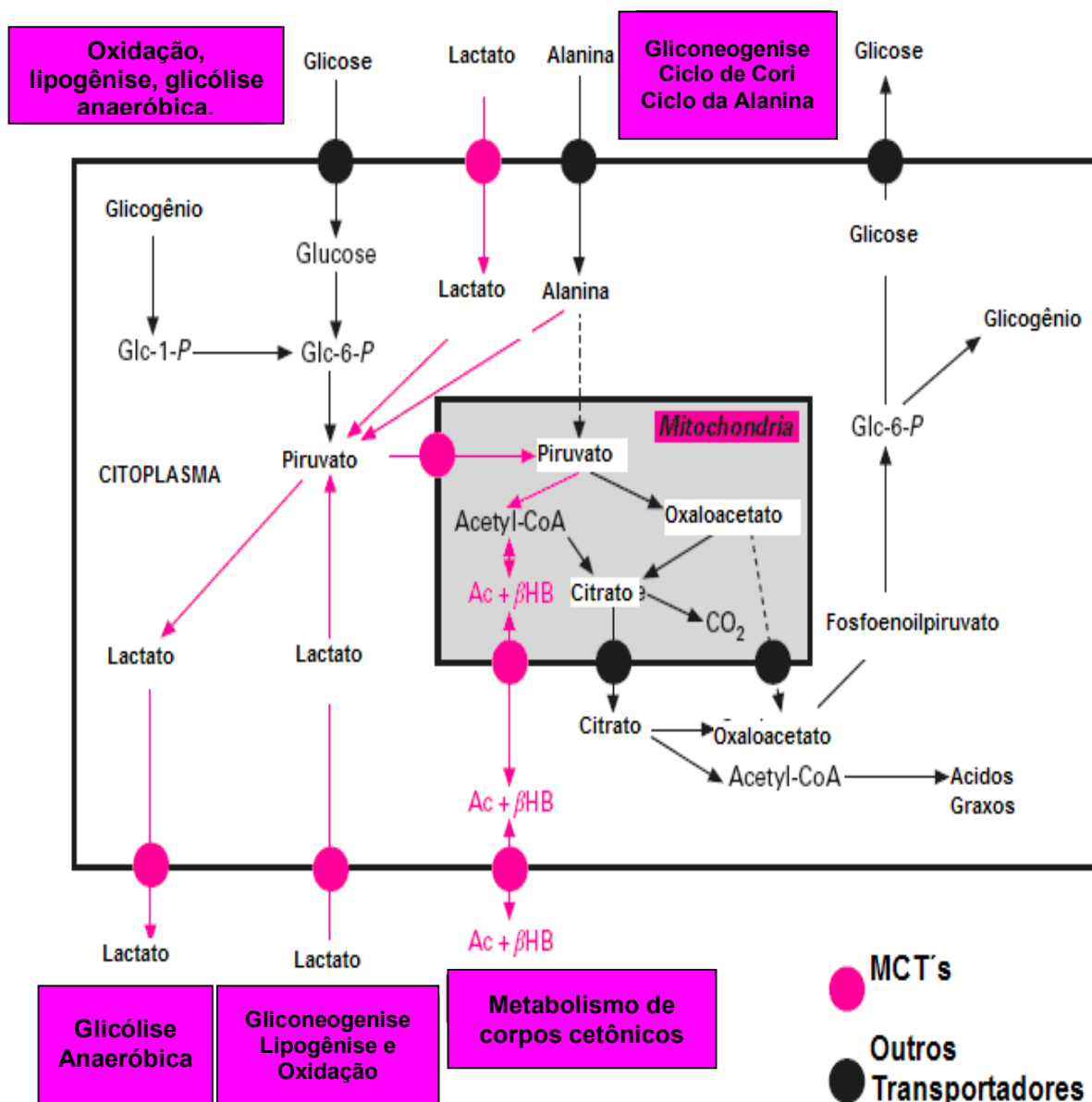


Figura 4. Esquema gráfico das vias metabólicas que necessitam de transporte de elementos monocarboxilados através das membranas mitocondrial e plasmática. As siglas, Glc-1-P e Glc-6-P, significam Glicose 1-fosfato e glicose 6-fosfato respectivamente; Ac representa acetoacetato; e β -HB representa β -hidroxibutirato (Adaptado de HALESTRAP & PRICE, 1999).

Estudos conduzidos por Polle & Halestrap (1992) utilizando inibidores específicos [4,4'-diisotiocianatostilbene-2,2'-*dissulfonato* (DIDS) e α -cyano-4-hidroxiacinato (CHC)], para o transporte do lactato em eritrócitos, mostraram que a massa molecular dos transportadores de lactato em eritrócitos de ratos era de aproximadamente 45kDa, enquanto que em coelhos essas proteínas tinham massa molecular entre 50kDa. Dados obtidos por meio da extração e separação eletroforética das proteínas de membrana.

No mesmo período, Kim et al. (1992), investigaram o sequenciamento da proteína responsável pela captação de mevalonato (MEV) em células do ovário de hamster chinês que exibiam uma taxa de transporte de mevalonato incomum. Após o sequenciamento e a clonagem dessa proteína, concluíram que a proteína não tinha uma altíssima taxa de transporte de mevalonato, mas que transportava outras substâncias, independente do mevalonato. Mais tarde, essa proteína transportadora foi chamada de MCT, pelo fato das substâncias que transportava serem elementos monocarboxilados.

Em seqüência, estudos de caracterização molecular conduzidos por Garcia et al. (1994_a) em tecido muscular de hamster demonstraram que tais proteínas tinham alta afinidade por substâncias monocarboxiladas e foram denominadas MCT1.

Em seqüência, o MCT1 de humanos, ratos e camundongos foram clonados e mostraram homologia de 95% com a seqüência protéica do MCT1 das células do ovário de hamster chineses obtidas anteriormente (KIM et al., 1992; GARCIA et al, 1994_b; JACKSON et al., 1995).

Entre os anos de 1994 e 1996, estudos empregando sequenciamento de DNA (GARCIA et al., 1994_b; JACKSON et al., 1995) identificaram a localização cromossômica do gene MCT1 em diversas espécies.

Assim, segundo Garcia et al. (1994) o MCT1 humano (SLC16A1) localiza-se no cromossomo 1 braço curto(p) nas bandas 13.2-12 (Figura 5).

Entretanto, apesar da identificação e clonagem do gene MCT1, os diversos estudos investigando o transporte de monocarboxilados em células vermelhas do sangue e outros tecidos, tais como o coração e hepatócitos, indicavam para a existência de uma família de MCT's (HALESTRAP et al., 1997; HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

2.3.2. MCT2

A hipótese da existência de uma família de MCT foi confirmada após o sequenciamento e a clonagem do MCT2 por Garcia et al. (1995), a partir de células de fígado de hamster. Estudo comparativo da seqüência genômica do MCT2 em relação ao MCT1 mostrou uma homologia de 60%, bem como similaridade nas características funcionais, nessa espécie. Entretanto, existe uma grande diferença na distribuição entre os tecidos desses dois MCT's (HASHIMOTO et al., 2005).

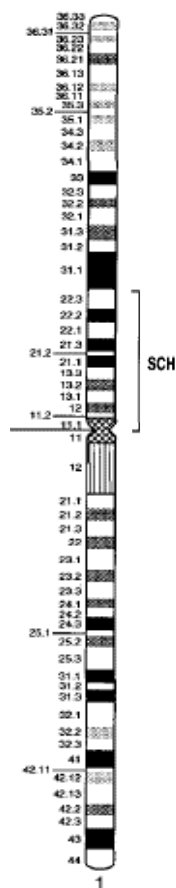


Figura 5. Mapa cromossômico do lócus do SLC16A1 humano. SCH representa a localização do gene humano do MCT1, 1p13.2-p12 cromossomo 1 (GARCIA et al., 1994).

Posteriormente, o MCT2 foi identificado e clonado em ratos e camundongos, o que permitiu identificar seus sítios de expressão (JACKSON et al., 1997; KOEHLER-STECH et al., 1998; GERHART et al., 1998).

Em ratos, camundongos e hamsters, o MCT1 foi encontrado em eritrócitos e na superfície basolateral das células epiteliais do intestino, já o MCT2 não é detectável nestes tecidos, mas é abundante na superfície dos hepatócitos, e no cérebro (JACKSON et al., 1997; KOEHLER-STECH et al., 1998; GERHART et al., 1998). No rim o MCT1 foi encontrado na superfície basolateral nas células dos túbulos proximais, enquanto que o MCT2 foi identificado apenas nos dutos distais (GARCIA et al., 1995). No epidídimo proximal e na cabeça dos espermatozóides também é possível identificar o MCT1, enquanto que o MCT2 é encontrado na cauda dos espermatozóides e em todo o epidídimo (GARCIA et al., 1995).

Apenas nos hamsters, ambos os transportadores foram identificados em miócitos e nas fibras vermelhas do músculo esquelético. Contudo, no músculo esquelético e no coração, o MCT1 se faz muito mais presente do que o MCT2 (JACKSON et al., 1994; GARCIA et al., 1995).

Em seguida o MCT2 em humanos foi clonado e identificado (JACKSON et al., 1994), seu gene (SLC16A7) está presente no cromossomo 12, braço q – banda 13 (12q13) (HALESTRAP & MEREDITH, 2004). Contudo, esse transportador é fracamente expresso na maior parte dos tecidos humanos (PRICE et al., 1998; LIN et al., 1998; HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

2.3.3. MCT3 e MCT4

O próximo membro da família dos MCT's identificado foi o MCT3, o qual foi clonado a partir de células epiteliais da retina de galináceos (YOON et al., 1997; PHILP et al., 2001; PHILP et al., 2003). Diferente do MCT1 e MCT2, que são encontrados em diversos tecidos, o MCT3 é encontrado apenas nas células epiteliais da retina (PHILP et al., 2003).

Estudos posteriores identificaram novos possíveis membros da família dos MCT's, as proteínas identificadas exibiam seqüências similares ao MCT1 (25-50%) e incluía uma isoforma humana que era em 67% similar ao MCT3 identificado em galináceos, 43% similar ao MCT1 e 45% similar ao MCT2. Essa proteína foi denominada MCT3 de mamíferos (WILSON et al., 1998; PRICE et al., 1998).

Investigações relacionadas à distribuição do MCT3 de mamíferos, por meio de quantificação de proteína e mRNA, demonstraram que essa isoforma é encontrada em diferentes tecidos, com uma forte presença no tecido muscular. Tal dado diverge do relatado para o MCT3 de galináceos, que foi encontrado apenas na retina dessa espécie (WILSON et al., 1998; PRICE et al., 1998).

Trabalhos conduzidos por Philp et al. (1997) e Yoon & Philp (1998) encontraram, em células epiteliais da retina de ratos e camundongos, um transportador equivalente ao MCT3 de galináceos, mas diferente do MCT3 de mamíferos indicado por WILSON et al. (1998). A distribuição desse novo MCT3 foi investigada por meio de anticorpos específicos e se mostrou restrita as células da retina, exatamente como o MCT3 de galináceos (YOON & PHILP, 1998; PHILP et al., 2001).

Nesse sentido, o primeiro MCT3 de mamíferos identificado não é equivalente ao MCT3 de galináceos, e sim o segundo MCT3 de mamíferos. Assim, o primeiro MCT3 de mamíferos, que foi encontrado inclusive no tecido muscular foi renomeado como MCT4 (SLC16A3), e esta localizado no cromossomo 17, posição 17q25. Já o segundo MCT3 de mamíferos, encontrado apenas nas células da retina, continuou sendo chamado de MCT3 ou REMP (SLC16A8, localização: cromossomo 22; 22q12.3-q13.2) (PHILP et al., 2001; HALESTRAP & PRICE, 1999; HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

Em estudos com células de xenopus, Bröer et al. (1998) confirmaram o transporte de lactato acoplado a um próton por meio do MCT4. O gene MCT4 é largamente expresso em diversos tecidos, principalmente àqueles com alto metabolismo glicolítico, fibras brancas do músculo esquelético, células vermelhas do sangue e astrócitos (PRICE et al., 1998; WILSON et al., 1998; DIMMER et al., 2000; BERGERSEN et al., 2002).

Tal apontamento destaca a importância desse transportador na manutenção de condições fisiológicas favoráveis à produção sustentada de energia em tecidos altamente glicolíticos (HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

Diferente do MCT1, o MCT4 não é largamente expresso pelas células cardíacas, exceto em ratos no período neonatal, onde o metabolismo glicolítico é importante para atender a demanda energética (HALESTRAP & PRICE, 1999; WILSON et al., 1998; HATTA et al., 2001).

O transportador MCT4 tem baixa afinidade pela maior parte dos substratos e inibidores que agem sobre o MCT1, assim os valores de K_m são cerca de 5 a 10 vezes maiores que no MCT1 (DIMMER et al., 2000).

2.3.4. MCT 5, 6 e 7

Poucos estudos estão disponíveis com as propriedades do MCT5 (SLC16A4), MCT6(SLC16A5) e MCT7(SLC16A6), esses transportadores são de 25% a 30% similares ao MCT1 (PRICE et al., 1998). Com relação a localização em humanos, estão: a) SLC16A4 (MCT5) no cromossomo 1; posição 1p13.3; b) o SLC16A5 (MCT6) no cromossomo 17; posição 17q25.1; e c) o SLC16A6 (MCT7) no cromossomo 17; posição 17q24.2.

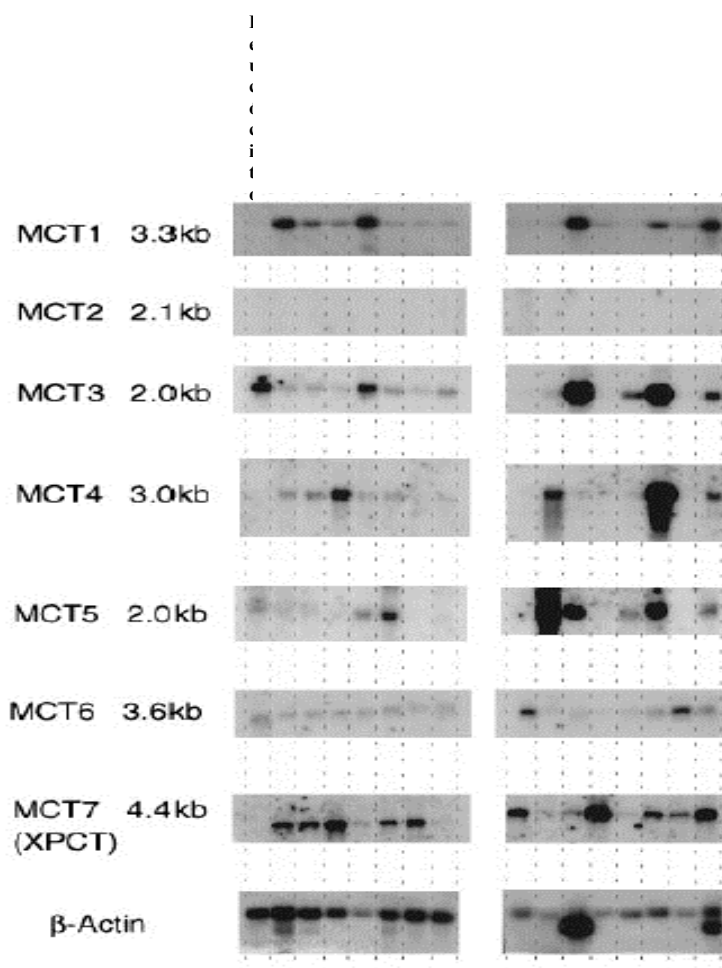


Figura 6. Northern Blot da distribuição das isoformas de MCT em diferentes tecidos humanos. No músculo esquelético as isoforma 1 e 4 são as mais encontradas. O MCT2 é pouco expresso em humanos. O MCT5 é fortemente expresso nos rins, e em menor escala na próstata, nos músculos e na placenta. O MCT6 é expresso no coração, músculos esqueléticos e fígado. O MCT7 é expresso no cólon, intestino, ovário, próstata, Timo, pâncreas, fígado, pulmão, cérebro e coração (PRICE et al., 1998).

Entretanto, alguns estudos investigaram, por meio Northern Blot, a distribuição dessas isoformas em tecidos humanos e de ratos (PRICE et al., 1998; BONEN et al., 2006).

Em humanos o MCT5 é relevantemente expresso nos rins, além de ser identificado, em menor escala na próstata, nos músculos esqueléticos, na placenta e no coração. Já o MCT6 é encontrado, em baixa concentração, apenas no pâncreas e no cérebro. Enquanto o MCT7 é encontrado no cólon, intestino, ovário, próstata, timo, pâncreas, fígado, pulmão, cérebro e coração (Figura 6) (PRICE et al., 1998; IWANAGA et al., 2006).

Bonen et al. (2006) identificaram baixa concentração de MCT5 em músculos de ratos (Gastrocnêmio branco e vermelho). No mesmo estudo, os autores observaram a existência de MCT6 no coração, no músculo esquelético e no fígado. Enquanto que o MCT7 foi observado no cérebro, nos testículos e no fígado.

Na figura 6 é possível observar a variação de expressão das diferentes isoformas de MTC (MTC 1;2;4;5;6;7), em humanos a partir de estudo realizado por Price et al. (1998), que utilizou diferentes tecidos em estado de repouso.

2.3.5. OUTROS MEMBROS DA FAMÍLIA MCT

O MCT8 faz parte da família dos MCT's apesar de não transportar lactato nem aminoácidos, mas sim hormônios tireoidianos (T3 e T4). Diferente dos outros MCT's, o MCT8 realiza o transporte desses hormônios de modo independente ao acoplamento de próton ou sódio (HALESTRAP & PRICE, 1999). Originalmente foi identificado como XPCT, logo após foi renomeado à MCT8 e está localizado no cromossomo Xq13.2 (LAFRENIERI et al., 1994; WILSON et al., 1998; PRICE et al., 1998).

O MCT8 é largamente expresso nos tecidos humanos, contudo, vale ressaltar que sua expressão é mais forte no coração e no fígado (PRICE et al., 1998). Em ratos, uma proteína homologa ao MCT8 foi identificada e é expressa em abundância no rim e no fígado (DEBRAND et al., 1998).

O fato que chama a atenção no gene do MCT8 (DXS128E) é que ele codifica uma proteína com seqüência N-terminal semelhante ao MCT1, entretanto, com um domínio PEST, seqüência que indica rápida degradação

por proteólise. Contudo a função dessa rápida degradação continua desconhecida (LAFRENIERI et al., 1994; RECHSTEINER & ROGERS, 1996; HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

O MCT9 (SLC16A9 – Cromossomo 10, posição 18B5.3) foi identificado a partir de pesquisas no genoma humano, assim como o MCT11(SLC16A11 - 17p13.1), o MCT12 (SLC16A12 - 10q23.31), o MCT13 (SLC16A13 - 17p13.1) e o MCT14 (SLC16A14 - 2q36.3), entretanto, não existem dados sobre suas propriedades, funções nem tão pouco sobre sua distribuição (HALESTRAP & PRICE, 1999).

2.3.6. MCT MITOCONDRIAL

Ao investigar o substrato energético predominante durante exercícios sustentáveis de baixa e moderada intensidade, Brooks (1998) observou que fatores endócrinos e intracelulares poderiam ser determinantes na seleção de substratos e que apenas um mecanismo intermediário entre o metabolismo oxidativo e glicolítico seria capaz de sustentar a demanda energética durante situações desse tipo. Visto que o lactato representa um metabólito chave na mediação entre tais vias metabólicas, nasceu a hipótese da existência de uma lançadeira intracelular de lactato.

A lançadeira intracelular de lactato foi proposta como uma via para os produtos da glicólise (piruvato e H^+), quando na forma de lactato serem transferidos para dentro da mitocôndria para oxidação. Em fibras vermelhas e células cardíacas a lançadeira-intracelular de lactato seria a principal via pela qual os carbonos e os equivalentes redutores oriundos da glicólise seriam transferidos à mitocôndria, assim, tornando o NAD^+ citoplasmático regenerado para continuar a glicólise. (BROOKS et al., 1999_{a,b}; CHATHAM et al., 2001; BURTZ et al., 2004; HASHIMOTO et al., 2005).

Apesar de o piruvato poder ser transferido para a mitocôndria, a maior parte desse metabólito é reduzido à lactato, principalmente em situações de hipóxia ou alta demanda energética, devido à alta atividade da LDH, principalmente no sentido da redução de piruvato à lactato (BROOKS 1999_{a,b}; GLADDEN, 2004; HASHIMOTO et al., 2005).

Devido a essas observações, a idéia de que o lactato retirado do ambiente extracelular era re-convertido em piruvato e H^+ no citosol pela LDH para posteriormente participarem do metabolismo oxidativo na mitocôndria, passou a ser questionada (GLADDEN, 2004).

A partir de então diversos estudos passaram a reportar evidências sobre a presença de componentes chave para a existência de um mecanismo de transporte de lactato na membrana mitocondrial.

Brooks et al. (1999_a), identificaram a presença de MCT1 na membrana interna de mitocôndrias isoladas de células cardíacas e musculares, por meio de Western Blotting, bem como, relataram a existência de LDH intra-mitocondrial (mLDH) após estudarem essas mitocôndrias.

Mais tarde, Brooks et al. (1999_b) observaram a captação e oxidação direta do lactato por mitocôndrias isoladas de células cardíacas, musculares e hepáticas de ratos, sem a necessidade de conversão prévia (no citoplasma) de lactato em piruvato e H^+ .

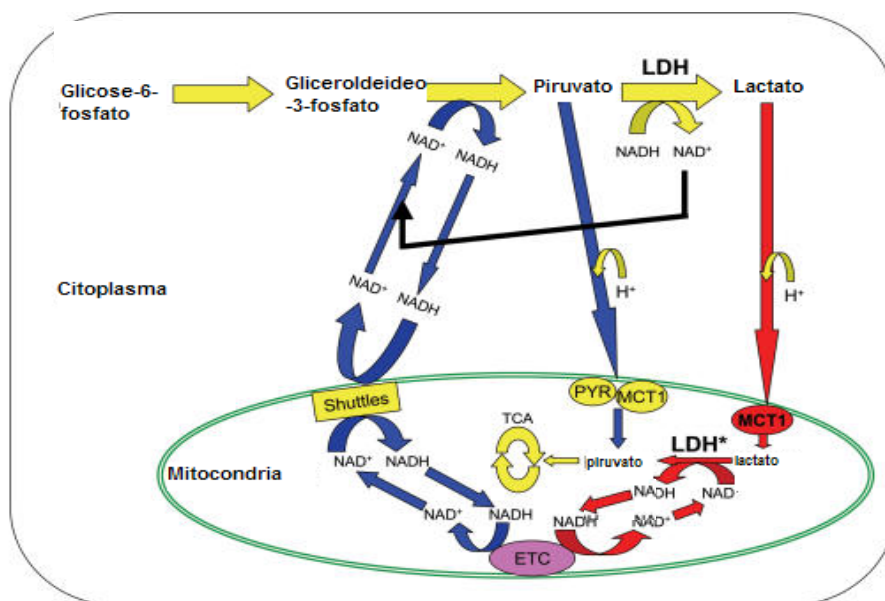


Figura 7. Ilustração do funcionamento do transporte intracelular de lactato (GLADDEN, 2004). A glicose é degradada a piruvato, esse pode ser transportado para a mitocôndria, o que acontece via MCT1 com acoplamento de H^+ , ou ser reduzido à Lactato. Esse último pode ser transportado até a mitocôndria pelo mesmo sistema, por meio de MCT1 quando acoplado a um H^+ . Dentro da mitocôndria a mLDH age sobre o lactato oxidando-o novamente à piruvato, que será oxidado no ciclo do ácido cítrico. Os agentes redutores produzidos pela glicólise na sua fase anaeróbica são transferidos, durante todo o processo, para dentro da mitocôndria e encaminhados para a cadeia de transporte de elétrons (CTE) por meio de lançadeiras específicas (malato-aspartato) ou acoplados ao MCT1 durante o transporte de piruvato ou lactato. LDH, Lactato Desidrogenase; LDH*, Lactato Desidrogenase Mitocôndrial; PYR, Piruvato; TCA, Ciclo do ácido cítrico; ETC, Cadeia de transporte de elétrons; SHUTTLES, lançadeira malato-aspartato.

Nesse contexto, o lactato produzido constantemente pela célula, mesmo em situações com taxa de produção aumentada devido ao grande metabolismo glicolítico, é transportado para dentro da mitocôndria por meio do transportador MCT1 existente na membrana mitocondrial interna. Na matriz mitocondrial o lactato é convertido à piruvato e H^+ pela ação da lactato desidrogenase mitocondrial (mLDH). Esse então sofre a ação da enzima PDH que o catalisa em acetil-CoA, o qual continua a ser oxidado no ciclo do ácido cítrico. Vale lembrar que não apenas o piruvato continua a ser oxidado, mas também os equivalentes redutores que resultaram da conversão de lactato em piruvato, nesse sentido, influenciando na atividade das lançadeiras malato-aspartato e glicerol fosfato (Figura 7) (BUTZ et al., 2004).

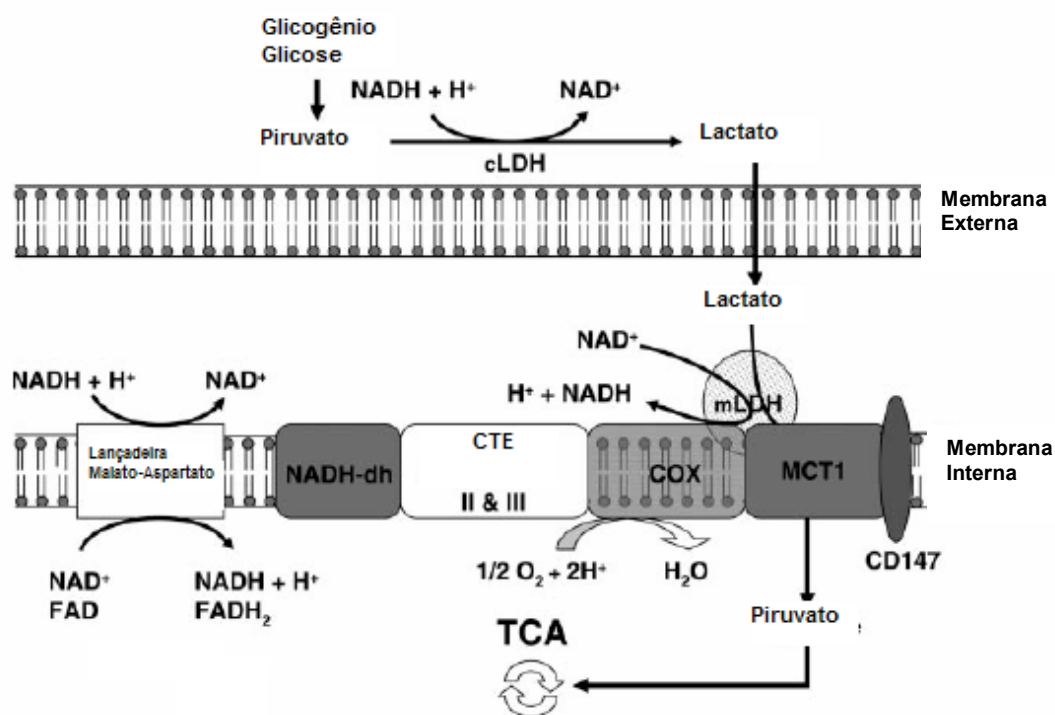


Figura 8. Ilustração do complexo mitocondrial de oxidação do lactato. Lactato é convertido a piruvato via mLDH em associação com a COX. O transporte de piruvato através da membrana interna da mitocôndria é facilitado pelo MCT1. GP: Glicerol Fosfato; Mal-Asp: Malato – Aspartato; ETC: Cadeia de transporte de elétrons; TCA: Ciclo do ácido cítrico. (HASHIMOTO et al., 2006).

Mais recentemente HASHIMOTO et al. (2006) investigaram a localização, por meio de scanner a laser confocal, da mLDH, do MCT1 mitocondrial, e da CD147, possível chaperona da proteína MCT1. Os resultados indicaram que esses elementos ficam localizados no retículo

mitocondrial e que interagem em grande escala com a citocromo oxidase (COX) e a CTE, confirmando a existência de um complexo mitocondrial específico para a oxidação do lactato. Na figura 8 é possível observar a interação entre os elementos que viabilizam a oxidação do lactato pela mitocôndria.

2.4. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MCT's

Em geral, os MCT's possuem entre 10 e 12 segmentos transmembrana (TM) alfa-helicoidal (12TM nos MCT's 1, 2, 3, 7 e 8; e entre 10 e 12TM para os demais MCT's), com as terminações N e C intracelulares e um grande laço (*loop*) intracelular entre os segmentos 6 e 7. Essa estrutura foi investigada por Polle et al. (1997) em eritrócitos inatos de ratos e pode ser observada na Figura 9.

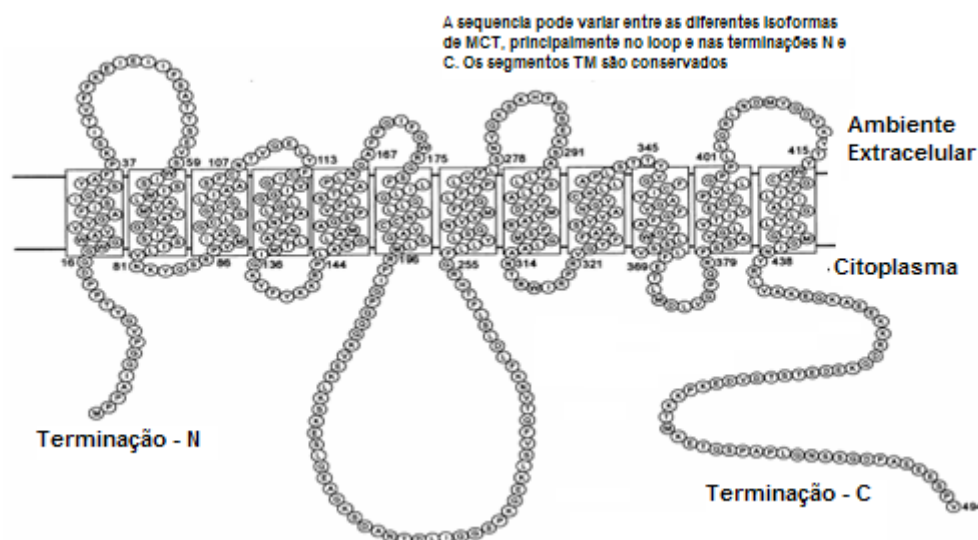


Figura 9. Proposta de tipologia do MCT1 (POLLE et al, 1997). De modo geral, os MCT's possuem entre 10 e 12 segmentos transmembrana (TM) alfa-helicoidal, com as terminações N e C intracelulares e um grande *loop* intracelular entre os segmentos 6 e 7. Essas características são comuns a todos os membros da família de transportadores. As metades N e C terminais da proteína transportadora possuem características diferentes. A metade N-terminal (hélices 1-6) tem um nível mais alto de conservação do que a metade C-terminal (hélices 7-12), o que propõe que a terminação N esteja associada ao acoplamento energético (via H^+ ou Sódio) e o setor C-terminal é determinante na seleção do substrato alvo. O *loop* intracelular entre os segmentos 6-7 pode variar sensivelmente entre os membros da família.

Segundo Juel & Halestrap (1999) essas características são comuns a todos os membros da família de transportadores, contudo, parece ser

improvável que todos os 12 segmentos estejam envolvidos diretamente no transporte de seus substratos. Entretanto, provavelmente são essenciais para outros aspectos de sua função, como a regulação da atividade do transporte e manutenção da estrutura protéica.

As regiões N e C terminais da proteína transportadora possuem características diferentes. A metade N-terminal (hélices 1-6) tem um nível mais alto de conservação do que a metade C-terminal (hélices 7-12), o que propõe que as metades possuam funções distintas. A porção N-terminal possivelmente é importante para o acoplamento energético (via H⁺ ou Sódio) e para a manutenção estrutural, enquanto a porção C-terminal é determinante na seleção do substrato alvo, uma vez que existem evidências que indicam que a alteração do tipo de ligação (Fenilalanina₃₆₀ para Cys) no segmento 10 do MCT1, altera o substrato específico de lactato/piruvato para mevalonato (KIM et al., 1992; JUEL & HALESTRAP, 1999).

Vale ressaltar ainda que a região da alça intracelular entre os segmentos 6-7 pode variar sensivelmente entre os membros da família. 93 resíduos são encontrados na alça do MCT7, enquanto que observa-se 103 resíduos no MCT5, 67 no MCT1, 49 no MCT2, 66 no MCT3, 47 no MCT6 e MCT8, além de 29 resíduos no MCT4 (HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

2.5. PROPRIEDADES GERAIS DO TRANSPORTE DE LACTATO VIA MCT's

O estudo do transporte de lactato em células vermelhas do sangue foi bem caracterizado por meio de estudos com técnicas empregando isótopos marcados (PHILP et al., 2005).

O mecanismo de transporte envolve uma ordem que inicia com o acoplamento de um próton e um anion do lactato ao transportador. Essa ação é seguida pela translocação do lactato e do próton, que atravessam a membrana plasmática para posterior liberação do lactato e do próton do outro lado da membrana (Figura 10) (DE BRUIJNE et al., 1983; 1985). Esse processo é reversível até o momento em que equilíbrio é alcançado, ou seja, a razão entre concentração de lactato intra e extracelular é igual à razão da concentração de H⁺ intra e extracelular ($[\text{lactato}]_{\text{dentro}}/[\text{lactato}]_{\text{fora}}=[\text{H}^+]_{\text{dentro}}/[\text{H}^+]_{\text{fora}}$), embora seja improvável que esse equilíbrio ocorra no tecido muscular.

O fator limitante para as taxas de fluxo de lactato é a liberação do lactato e do H^+ após atravessarem a membrana, o que faz com que o ciclo do transporte através da membrana esteja completo, permitindo que o transportador retorne ao seu estado livre.

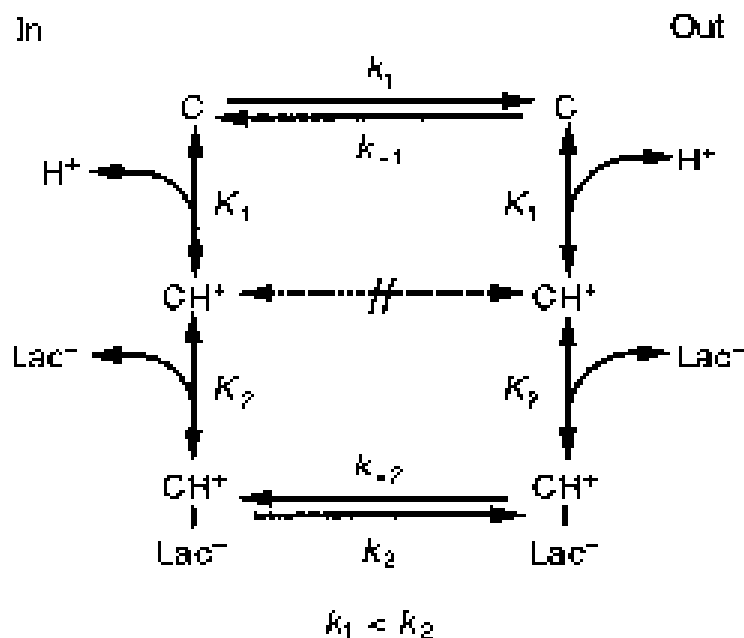


Figura 10. Representação esquemática da cinética de transporte do MCT1. Taxas constantes de concentração de H^+ determinam o transporte para dentro ou para fora da membrana plasmática de diferentes substâncias monocarboxiladas. O equilíbrio entre as concentrações emperra o sistema (JUEL & HALESTRAP, 1999).

Com altas taxas no transporte, o pH pode ser reduzido a algo entre 6 e 8 no lado em que o lactato é adicionado, sob essa situação o transporte é alterado pela redução na taxa de transporte de lactato, por meio do impedimento da conclusão do ciclo completo do transporte.

Apesar de grande parte dos estudos investigarem as propriedades e características do MCT1, parece que, de maneira geral, as propriedades e características do transporte de monocarboxilados é similar em todos MCT's (RITZHAUPT et al., 1998).

Lin et al. (1998), ao investigar as propriedades do MCT2, expressos em células humanas e células de xenopus, demonstraram que o MCT2, apesar de pouco expresso em tecidos humanos, tem grande afinidade por piruvato. Fato que também foi observado em células de ratos por Bröer et al. (1998).

Não existem análises detalhas a respeito das características e propriedades do MCT3 e do MCT4, entretanto, existem apontamentos que demonstram a similaridade de suas propriedades com as do MCT1 em relação aos aspectos de mecanismo de transporte e afinidade pelo lactato (WILSON et al., 1998).

Contudo existem pequenas diferenças que devem ser ressaltadas. Provavelmente, a principal diferença funcional entre o MCT1 e o MCT4 esteja na velocidade de transporte do lactato. Estudos demonstram que o MCT4 possui um K_m para o lactato entre 10-22mM. Tais valores são muito mais altos do que os encontrados para o MCT1, provavelmente pelo fato de que o MCT4 tem menos afinidade por diferentes substratos e inibidores quando comparado ao MCT1 (JUEL, 1997; JUEL & PILLEGARD, 1998).

2.6. ISOFORMAS MAIS ENCONTRADAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

O tecido muscular esquelético representa o sítio de maior produção e consumo de lactato (GLADDEN, 1998; BROOKS, 1998, BROOKS, 2000, PHILP et al., 2005). A produção e o consumo de lactato ocorrem em sítios específicos, onde as fibras brancas, com baixo conteúdo mitocondrial e altamente dependente da glicólise anaeróbica para ressíntese de ATP, são as maiores produtoras de lactato, enquanto que as fibras vermelhas, altamente vascularizadas e com grande quantidade de mitocôndrias, são avidas consumidoras desse metabólito (HALESTRAP & PRICE, 1999; JUEL & HALESTRAP, 1999; PILEGAARD et al., 1999_b; BONEN et al. 2000_a; BROOKS, 2000; HALESTRAP & MEREDITH, 2004; GLADDEN, 2004; HASHIMOTO et al. 2005; PHILP et al., 2005; BONEN et al., 2006).

Na transição do repouso para a atividade física existe um crescimento rápido na demanda energética, o que exige que a atividade glicolítica exceda a atividade oxidativa, promovendo aumento das concentrações intracelulares de lactato (SPRIET et al., 2000; McARDLE et al., 2003; VOET & VOET, 2006).

O lactato, junto de um H^+ , é removido da célula para a corrente sanguínea e posteriormente recolhido por outra célula muscular para continuar sendo utilizado como substrato energético (COGGAN et al., 1992; GLADDEN, 1998_{a,b}; THOMAS et al., 2005). Tal capacidade torna o lactato um importante

intermediário na produção energética nos músculos esqueléticos, criando uma conexão entre as vias glicolítica e oxidativa (BROOKS, 2002; 2007).

Nesse contexto, observa-se que o músculo esquelético necessita de um rápido transporte de lactato por meio da membrana plasmática tanto para fora quanto para dentro da célula, a qual mostra-se específico para cada tipo de fibra e sua carga de trabalho (POOLE & HALESTRAP, 1993; BROOKS, 2000).

Inúmeros pesquisadores investigaram a presença dos MCT's em tecidos musculares com diferentes características, e confirmaram que esse tipo de tecido co-expressa uma variedade de membros da família MCT (POOLE & HALESTRAP, 1993; BROOKS et al., 1999_{a,b}; PILEGAARD et al., 1999_b; BROOKS, 2000).

De maneira geral, observa-se uma pequena concentração de MCT2, MCT5, MCT6 e MCT8 no músculo esquelético. Por outro lado o MCT1 e o MCT4 são largamente encontrados (PILEGAARD et al., 1999_b; BONEN et al., 2000_a; HASHIMOTO et al., 2005; BONEN et al., 2006). Vale destacar ainda, que estudos também encontraram o MCT1 na membrana interna de mitocôndrias (BROOKS et al., 1999_{a,b}; HASHIMOTO et al., 2006).

Entretanto, mesmo entre os dois MCT's mais presentes no tecido muscular, existem diferenças em suas distribuições.

A magnitude da presença do MCT1 está diretamente relacionada com a capacidade oxidativa da fibra muscular exatamente por possuir habilidade excepcional em remover o lactato da corrente sanguínea para o interior das células (BONEN et al., 2000_a). O fato da presença desse transportador na membrana mitocondrial reforça a afirmação de que o MCT1 é responsável pela remoção do lactato circulante e fator primordial no direcionamento do lactato até os sítios de oxidação (BONEN et al., 2000_a; PHILP et al., 2005).

Por outro lado, o MCT4 é amplamente encontrado em fibras brancas de contração rápida e pouco expresso por fibras oxidativas, de contração lenta (WILSON et al., 1998; PILEGAARD et al. 1999; BONEN et al., 2006). Tal constatação aponta para o fato de que o MCT4 facilita a saída do lactato de dentro da célula para o líquido extracelular.

Essas observações indicam existir uma relação funcional oposta entre MCT1 e MCT4 nas fibras de um mesmo músculo, dependendo da composição de fibras do referido músculo.

Bonen et al., (2000_a) investigaram a distribuição, o mRNA e a possível existência de um *pool* intracelular do MCT1 e do MCT4 em diferentes músculos de ratos (porções brancas e vermelhas do gastrocnêmio, plantar, EDL e porções brancas e vermelhas do tibial anterior). Os investigadores também pesquisaram a presença dos MCT's em diferentes regiões da célula (Membrana plasmática, Tríades, Túbulos T, Retículo Sarcoplasmático).

Os resultados mostraram que existe uma alta relação ($r=0,94$) entre o mRNA e a proteína do MCT1, fato que não se reproduz em relação ao MCT4. A relação invertida entre MCT1 e MCT4 nos tecidos foi confirmada ($r=-0,94$). Também identificou-se relação entre o conteúdo das fibras e a presença dos transportadores, quanto mais característica glicolítica possuía a fibra, mais MCT4 ($r=0,88$) e menos MCT1 ($r=-0,97$) essa fibra expressava.

Ainda de acordo com Bonen et al. (2000_a), em relação à localização dos transportadores na fibra, ambos os transportadores pesquisados eram fortemente presentes na membrana plasmática. Entretanto, o conteúdo dessas proteínas em outras regiões da célula variou bastante. O MCT1 foi observado praticamente todo na membrana plasmática, enquanto que o MCT4 foi encontrado em quantidades substanciais na membrana, nos túbulos T, nas tríades e no retículo sarcoplasmático. Também foi observada a existência de um *pool* de MCT4 intracelular, o que levou os pesquisadores a indicarem que possivelmente esse transportador pudesse ser translocado para a membrana celular durante a contração muscular para permitir a saída do lactato. Contudo, mais tarde, TONOUCI et al., (2002), refugaram tal hipótese ao não observar presença de *pool* intracelular relevante de MCT4 em músculos de ratos.

Mais recentemente, BONEN et al. (2006) investigaram a distribuição dos MCT's em diferentes tecidos de rato, entre eles o sóleo e o gastrocnêmio em suas porções vermelha e branca, bem como no músculo vasto lateral de humanos por meio da técnica de *Western Blotting* utilizando anticorpos específicos para os MCT's 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8.

Os pesquisadores identificaram que, em ratos, o MCT1 é expresso em diversos tecidos, entretanto, corroborando com tantos outros estudos (BONEN et al., 2000_{a,b}; BONEN, 2001; HATTA et al., 2001), identificaram grande quantidade de MCT1 no tecido muscular esquelético, principalmente nos tecidos com predominância de fibras vermelhas, como o sóleo e a porção

vermelha do gastrocnêmio, bem como no coração. O MCT2 também foi identificado em grande quantidade nos músculos esqueléticos, contudo, sua função nesse tecido ainda não está esclarecida. Assim como tantos outros estudos, Bonen e seus colaboradores (2006) identificaram ampla presença do MCT4 nos músculos esqueléticos (BAKER et al., 1998; TONOUCI et al., 2002; SEPPONEN et al., 2003; JUEL et al., 2004), predominantemente em tecidos com alta taxa glicolítica (DIMMER et al., 2000; BONEN et al., 2000_a; TONOUCI et al., 2002). Os MCT's 5 e 6 também foram encontrados, só que em baixas concentrações nos tecidos musculares dos animais.

No Vasto lateral de humanos, Bonen et al. (2006) identificaram a expressão principalmente de MCT1 e MCT4, mas também observaram MCT2, 5, 6, 7 e 8, particularmente esse último, em muito baixas concentrações. Tais apontamentos corroboram com estudos prévios realizados por diversos pesquisadores (DUBOUCAUD et al., 2000; PILEGAARD et al., 1999_{a,b}).

Bonen et al. (2006) investigaram ainda os valores de K_m nos MCT's 1, 2 e 4 para os substratos piruvato e lactato. A investigação mostrou uma taxa de transporte mais alta para o lactato em relação ao piruvato em todos os transportadores. Especificamente em relação ao lactato, foram observados valores de K_m (mmol/L) de 4-6, 0,74 e 28-34 para MCT1, MCT2 e MCT4 respectivamente. Tais apontamentos corroboram com estudos de Juel (1997) e Juel & Pilegaard (1998) que mostram uma maior capacidade de transporte do MCT4 em relação aos demais transportadores.

Em uma análise final desses autores, podemos concluir que músculos extremamente oxidativos, como o sóleo ou o gastrocnêmio vermelho, que possuem um grande conteúdo de fibras oxidativas (Tipo I), expressam largamente o MCT1, tanto na membrana plasmática como na membrana mitocondrial. Enquanto que em tecidos com grande conteúdo de fibras de contração rápida, como o gastrocnêmio branco ou a porção branca do tibial anterior, o MCT1 é pouco expresso. Pilegaard et al. (1999_b) observaram relação direta entre a densidade de MCT1 e a ocorrência de fibras tipo I em tecidos humanos. Tais apontamentos sugerem que a presença do MCT1 nesse tipo de fibra reflete a necessidade do transporte de lactato para dentro da célula para servir como substrato para o metabolismo aeróbico (WILSON et al., 1998; PILLEGARD et al., 1999_{a,b}).

Por outro lado, o MCT4 é presente em todos os tipos musculares, entretanto, em menor concentração em tecidos com predominância oxidativa, tanto em animais quanto em humanos (PRICE et al., 1998; WILSON et al., 1998; DIMMER et al., 2000; BERGERSEN et al., 2002). De acordo com Pilegaard et al. 1999_b, em humanos, a concentração de MCT4 é independente do tipo de fibra, embora seja mais expresso em tecidos com predominância de fibras brancas, de contração rápida. Outra característica interessante é a taxa de transporte do MCT4 ser muitas vezes mais alta que a taxa de transporte de outros transportadores da família. Tais apontamentos demonstram que o MCT4 é importante para a saída do lactato da célula para assim promover condições ideais para a manutenção do fornecimento de energia pela glicólise anaeróbia (HALESTRAP & PRICE, 1999; BONEN et al, 2006).

Nesse sentido, a forte presença dessas duas isoformas de MCT no músculo esquelético, finda por confirmar que esse tecido é, de fato, o maior produtor e consumidor de lactato. Uma vez que no mesmo tecido, células com forte característica metabólica para a produção de lactato expressam um transportador específico para realizar o rápido transporte do lactato para fora da célula (MCT4), enquanto que células com forte característica metabólica e infra-estrutura enzimática para oxidar o lactato expressam proteínas específicas para direcionar o lactato que esta no líquido extracelular até os sítios de oxidação. Esclarecendo como ocorre a rede de produção e consumo de lactato durante o exercício entre células vizinhas, de um mesmo tecido, bem como essa rede funciona entre células de músculos ativos (potenciais produtores) e células distantes, de tecidos em repouso ou em menor atividade (potenciais consumidores) durante o exercício.

Nesse sentido, a quantidade e a atividade desses transportadores podem influenciar diretamente na concentração de lactato plasmático durante a realização de exercícios (McDERMOTT & BONEN, 1993_a). Levanta-se então a hipótese de que uma maior quantidade desses transportadores em tecidos ativos e/ou inativos durante a realização de um exercício específico, pode elevar a intensidade de execução do exercício para uma mesma concentração de lactato sanguíneo.

Assim, o entendimento dos mecanismos indutores e de controle da expressão dessas proteínas no tecido muscular se faz necessário para

compreender como os MCT's influenciam no controle da concentração sanguínea de lactato, bem como, desvendar se essa expressão pode ser modulada em razão da realização aguda ou crônica de exercícios físicos.

2.7. EXPRESSÃO DOS MCT's NO MÚSCULO ESQUELÉTICO FRENTE AO EXERCÍCIO FÍSICO

O controle da expressão gênica dos MCT's em grande parte dos tecidos é pouco conhecida, uma vez que a maior parte dos estudos que investigam essa temática o fazem no sentido de identificar a sua distribuição nos tecidos esqueléticos (HALESTRAP & PRICE, 1999; PHILP et al., 2005).

Sabe-se que o treinamento de característica aeróbica de intensidade leve à moderada, bem como o treinamento de alta intensidade promovem aumento na taxa de transporte de lactato (JUDEL, 2001; JUDEL et al., 2004; FERGUNSON et al., 2007).

McDermott & Bonen (1993_b), indicaram que a velocidade de transporte de lactato (Km) em células musculares de ratos aumenta após 6 semanas de treinamento aeróbico em esteira rolante.

Em estudo similar, Pilegaard (1993) demonstrou que a taxa de transporte de lactato aumentou expressivamente após 7 semanas de treinamento de natação em baixa intensidade (50% $VO_{2máx}$). Durante atividades mais intensas (moderada - 90% $VO_{2máx}$ e alta - 112% $VO_{2máx}$) de caráter intervalado em esteira rolante também observaram aumento na taxa de transporte de lactato, bem como, a regressão de taxa após 5 semanas de destreino.

Efeitos similares foram encontrados por McCullagh et al. (1996) ao investigarem músculos de ratos (Gastrocnêmio, Sóleo e Extensor Longo dos Dedos) submetidos à estimulação elétrica de baixa frequência (10Hz, 50 microssegundos, 24h/dia) durante 7 dias.

Em comum, esses últimos estudos demonstram que a resposta de aumento na taxa de transporte de lactato se deve, principalmente, ao desenvolvimento da capacidade oxidativa das fibras musculares, ao aumento na quantidade no número de transportadores e ao aumento da afinidade desses transportadores por seu substrato, no caso o lactato.

Tais resultados determinaram que a próxima questão a ser elucidada era a relação entre alterações na taxa de transporte de lactato e alterações na expressão de MCT's.

Baker et al. (1998) identificaram que, de fato, a alteração na taxa de transporte de lactato e a expressão de MCT's estavam relacionadas. Ao investigar os efeitos de 3 semanas de treinamento moderado e intenso em esteira rolante na expressão do MCT1 e na taxa de transporte de lactato em músculos esqueléticos de ratos da espécie Sprague-Dawley (gastrocnêmio vermelho e branco; sóleo e EDL) e no coração, esses autores observaram que os animais submetidos a exercício moderado não tiveram aumento na expressão de MCT1 nos músculos esqueléticos, já no coração encontraram aumento expressivo do MCT1 (36%). Nos animais submetidos ao treinamento de alta intensidade os autores observaram aumento da expressão do MCT1 no músculo sóleo (70%), na porção vermelha do gastrocnêmio (94%) e no coração (44%). Vale destacar que o aumento no MCT1 do coração ocorreu independentemente do aumento da capacidade oxidativa (medida pela atividade da enzima citrato-sintase) desse tecido, indicando uma modulação na seleção do substrato nos miócitos. Tais resultados mostram que a expressão dos transportadores de lactato responde frente ao exercício, contudo, ela é dependente da intensidade do exercício e da característica do tecido, sendo os tecidos com característica aeróbica, mais propensos a aumentar a expressão dos transportadores.

Entretanto, Juel & Pilegaard (1998), após investigarem a taxa de transporte de lactato em vesículas de diferentes músculos (vermelhos, brancos e mistos) sob diferentes condições (denervados, de ratos idosos, submetidos a exercício moderado e a exercício de alta intensidade, submetidos à hipóxia e a hipotireoidismo) concluíram que o tipo de fibra que mais responde frente ao exercício é a fibra de contração rápida (branca), levando a crer que as maiores alterações na expressão ocorressem no MCT4, infelizmente, não foi investigado a expressão ou atividade do MCT4 nesse trabalho.

Apesar de parecerem controversos, esses estudos foram importantes para definir a hipótese que o exercício pode promover melhora na capacidade de transporte do lactato acoplado ao H^+ por meio de modulação na expressão do MCT1 e MCT4. Tal hipótese ganhou força após estudos com músculos sem

inervação onde a redução na capacidade de transporte de lactato foi identificada ao lado da redução na quantidade das proteínas MCT1 e MCT4 (PILEGAARD, 1994; McULLAGH et al., 1995; WILSON et al., 1998).

O aumento na expressão dos MCT's em resposta ao treinamento tem sido investigado em diferentes tecidos, períodos de treinamento e protocolos de treinamento tanto em animais quanto em humanos.

Green et al. (2002) investigaram os efeitos agudos de uma única sessão de exercício em cicloergômetro com intensidade moderada ($60\%VO_{2\text{pico}}$) e duração entre 5-6 horas (com intervalos a cada 60 minutos) na expressão de MCT1 e MCT4 do vasto lateral de homens sedentários. O tecido foi obtido por meio de biópsia antes, e após 2, 4 e 6 dias. Os pesquisadores identificaram por meio de *Western Blotting* aumento tanto de MCT1 (121%) quanto de MCT4 (120%), 4 dias após o exercício. Vale destacar que após 6 dias do exercício a concentração dos transportadores retornou aos níveis pré exercício.

Comportamento oposto foi identificado por Tonouchi et al. (2002) ao investigarem vesículas de músculos dos membros inferiores de ratos após estimulação elétrica de baixo volume (50-60V, 100Hz, 10 minutos). Os pesquisadores investigaram o conteúdo protéico de MCT1 e MCT4 (*Western Blotting*), o transporte de lactato e o conteúdo de glicogênio imediatamente após os 10 minutos de estimulação. Os resultados indicaram redução do conteúdo de glicogênio muscular em todos os tecidos, exceto no sóleo. A absorção de lactato apenas sofreu aumento significativo quando a concentração externa de lactato excedeu 20mM. Contudo, o conteúdo dos transportadores sofreu redução de 10% e 20% para o MCT1 e MCT4 respectivamente, o que dificultou, por parte dos autores, o entendimento de como o aumento da captação de lactato pode ter ocorrido.

Posteriormente, Coles et al. (2004) investigaram o mRNA (*Northern Blotting*) e o conteúdo protéico (*Western Blotting*) de MCT1 e MCT4 no músculo sóleo e gastrocnêmio, em suas porções branca e vermelha, de ratos em diferentes períodos (imediatamente, 5, 10 e 24 horas) após duas horas (4 séries de 30 minutos com intervalos de 30 minutos) de exercício ($21\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, 15% de inclinação) em esteira rolante. Os resultados mostram aumento do conteúdo (pico 10 horas após) e do mRNA (pico 10 horas após) do MCT1 em todos os tecidos estudados. Por outro lado, o conteúdo de MCT4 aumentou

expressivamente no gastrocnêmio vermelho e no sóleo, enquanto que no gastrocnêmio branco não foi observada nenhuma alteração. Já o mRNA dessa isoforma não sofreu alterações no gastrocnêmio branco e, assim como MCT1, teve aumento significativo 10 e 24 horas após o exercício no gastrocnêmio vermelho e no sóleo (pico após 10 horas).

Em síntese, nota-se que as respostas são distintas em tecidos específicos e em todos os casos a elevação temporária do conteúdo protéico retornava as concentrações de repouso 24 horas após o exercício. Vale destacar que os autores colocam os genes dos MCT's em um grupo de genes que é rapidamente induzido frente ou exercício, sugerindo a existência de mRNA em baixas concentrações no interior da célula.

De fato, existe uma série de genes que o mRNA fica presente em baixíssimas concentrações na célula, e são induzidos rapidamente para que funções metabólicas específicas sejam suportadas. Nesse sentido, os genes de alguns MCT's fariam parte dessa família.

Tais apontamentos mostram que uma sessão única de exercício pode promover aumento tanto de MCT1 quanto de MCT4 em tecidos com grande conteúdo de fibras vermelhas (sóleo e gastrocnêmio vermelho), corroborando com hipóteses lançadas por estudos anteriores (PILEGAARD, 1993; McDERMOTT & BONEN, 1993_a; McCULLAGH et al., 1996; BAKER et al., 1998).

Por outro lado, Yoshida et al. (2004) observaram aumento do MCT1 após 6 semanas de corrida voluntária (em roda de corrida) no coração (50%), e nos músculos tibial (60%) e plantar (31%), entretanto, foi observada redução dessa proteína no sóleo (20%). O MCT4 não sofreu nenhuma alteração frente ao estímulo oferecido. Fica sugerido assim que exercícios de baixa intensidade parecem não exercer estímulo suficiente para induzir alterações no MCT4 e que não há relação direta entre as respostas do MCT1 e do MCT4.

De fato, Bonen (2000) e Tounouchi et al. (2002) colocam que as mudanças no transporte de lactato não podem ser explicadas por alterações concomitantes no MCT1 e no MCT4 (BONEN, 2000; TOUNOUCHI et al., 2002).

Nesse sentido, estudos mais recentes têm investigado a expressão do MCT1 e MCT4 frente a exercícios de alta intensidade.

Na tentativa de identificar quais fatores estavam relacionados à indução da expressão dessas proteínas, Thomas et al. (2007) investigaram o efeito do treinamento de alta intensidade (6-12 séries de 2 minutos a 80% da velocidade de pico com intervalos de 1 minuto entre as séries, 5 vezes por semana) durante 5 semanas no conteúdo de MCT1 e MCT4 nos músculos sóleo e EDL de ratos com e sem indução de acidose antes do exercício. Os pesquisadores indicaram que a resposta da expressão do MCT1 e do MCT4 é dependente do tipo de fibra, e que a acidose (alta concentração de H^+) parece ser importante para induzir a expressão, principalmente do MCT4, após um período de treinamento. Os resultados mostraram aumento similar do MCT1 no músculo sóleo tanto nos animais placebo quanto nos animais com acidose induzida. Já no que diz respeito à expressão do MCT4, os autores verificaram aumento significativo (115%) apenas no sóleo e sob indução de acidose. Não foram encontradas alterações no conteúdo protéico do extensor longo dos dedos (EDL) sob nenhuma condição.

Por outro lado, a resposta aguda da expressão dessas proteínas frente situações de acidose parece não ser a mesma.

Messonier et al. (2007) investigaram o conteúdo de MCT1, MCT4 e NHE1 (Na^+/H^+ exchange1, transportador de sódio dependente de H^+) no vasto lateral ao fim de uma única sessão de exercício supra-máximo (120% do $VO_{2máx}$) em cicloergômetro até a exaustão em humanos sedentários sob indução de acidose (ingestão prévia de citrato de sódio a 0,5g/kg corporal) e placebo (ingestão prévia de lactose 0,5g/kg corporal). Os autores identificaram correlação positiva entre a capacidade total de trabalho e o conteúdo de MCT1, MCT4 e NHE1. Entretanto, a acidose induzida promoveu redução na capacidade total de trabalho, além de ter uma correlação negativa com o conteúdo de todas as proteínas estudadas. Tais resultados demonstram a importância do transporte de H^+ para a manutenção da alta produção energética, enquanto que a acidose, além de limitar a produção energética, ainda reduz a condição da célula de sintetizar novas proteínas transportadoras.

Bishop et al. (2006) produziram resultados similares ao investigarem 6 mulheres atletas praticantes de hockey. Nesse estudo, os indivíduos foram submetidos a 45 segundos a 200% do VO_{2pico} em cicloergômetro e biópsia do vasto lateral foi realizada antes e imediatamente após a sessão. Redução de

ATP, PCr e pH foram identificadas, bem como aumento do lactato. O MCT1 e o MCT4 sofreram redução (24% e 26%, respectivamente) o que foi acompanhado por forte redução na capacidade de tamponamento. Os autores sugerem que a redução na capacidade de tamponamento se deu exatamente pela dificuldade de transportar o lactato, uma vez que seus transportadores foram encontrados em menor quantidade devido às altas concentrações de H^+ e conseqüente baixo pH intra e extracelular decorrente da atividade física realizada.

Por outro lado, situações em que ocorra a produção de lactato (atividades com alta dependência glicolítica), mas que mantenham o pH em homeostasia parece promover estímulo à expressão de transportadores relacionados a essa via (Lactato – MCT's e GLUT4 – glicose).

Green et al. (2002) submeteram 12 indivíduos sedentários à um protocolo de exercício elaborado com o intuito de promover drástica redução no conteúdo de glicogênio muscular. O exercício consistia em 16 séries de 6 minutos com intensidade de 91% do VO_{2pico} e intervalos de 54 minutos entre as séries (1 série por hora durante 16 horas). Foi realizada biópsia do vasto lateral antes da primeira série, e após as séries 1, 2, 9 e 16. Os resultados indicaram aumento nas proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico, principalmente o MCT4 e o GLUT4. O MCT4 sofreu uma rápida indução a partir da série 9, se mantendo elevado em relação ao controle até a última avaliação na série 16. Já o GLUT4, sofreu aumento gradual desde a primeira série. Por outro lado, o MCT1, apesar de demonstrar tendência ao aumento, não sofreu alterações significativas durante o período do exercício. Tais apontamentos levam a crer que o exercício de alta intensidade, que não comprometa extremamente o equilíbrio metabólico das células, parece tratar de estímulo interessante para a indução de proteínas como o GLUT4 e o MCT4.

Em estudo anterior, EVERTSEN et al. (2001) identificaram respostas similares ao verificar o efeito da intensidade do treinamento nos transportadores de lactato e no limiar de lactato. Vinte esquiadores de elite na modalidade *cross-country* (11 homens e 9 mulheres) foram treinados durante 5 meses em dois modelos de treinamento, moderado (60-70% $VO_{2máx}$) e intenso (80-90% $VO_{2máx}$), cada modelo foi aplicado em 10 indivíduos. Antes e após o período de treinamento os indivíduos foram submetidos a teste máximo em

esteira para determinação do limiar de lactato e velocidade máxima. Biópsia do músculo vasto lateral foi realizada antes e após o período do experimento para análise do conteúdo de MCT1 e MCT4, da distribuição dos tipos de fibras e da atividade das enzimas PFK, succinato desidrogenase (SDH), citrato sintase (CS), glicerol-3-fosfato desidrogenase (HBDH). O conteúdo da enzima ATPase foi utilizado para classificar as fibras em fibras lentas, fibras rápidas A ou fibras rápidas B.

Dentre os principais resultados pode-se mencionar que não houve diferença entre os grupos no limiar de lactato ou na velocidade máxima de corrida após o treinamento. Entretanto, apenas o grupo submetido ao treinamento de alta intensidade mostrou aumento significativo nessas variáveis quando comparados os períodos pré e pós treinamento. No que diz respeito à distribuição das fibras musculares, o vasto lateral dos esquiadores era composto em média por $56 \pm 3\%$ de fibras lentas, $28 \pm 2\%$ de fibras rápidas tipo A e $16 \pm 2\%$ de fibras rápidas tipo B, tanto antes quanto após o período do treinamento.

Em relação ao conteúdo de MCT1, não foi observada nenhuma alteração nos indivíduos submetidos ao treinamento de alta intensidade, diferente dos indivíduos submetidos ao treinamento moderado, que experimentaram aumento no conteúdo dessa proteína. Contudo, o MCT4 não sofreu nenhuma alteração em ambos os grupos. Vale destacar ainda que os autores não observaram relação entre a atividade enzimática das enzimas estudadas e o conteúdo de MCT1 e MCT4. Entretanto, observou-se relação entre a concentração de lactato 20 minutos após o teste máximo em esteira e a concentração de MCT1. Tais apontamentos demonstram que a expressão e a concentração dos transportadores de lactato, principalmente do MCT1, respondem positivamente a estimulação crônica e que esse transportador tem papel fundamental na oxidação do lactato após o exercício.

Mais recentemente, BURGOMASTER et al. (2007) investigaram a resposta de diversos transportadores da célula muscular esquelética de humanos após treinamento intervalado de alta intensidade. Para tal, os pesquisadores submeteram oito homens jovens e ativos a um treinamento que consistia em realizar 4-6 séries de 30 segundos na velocidade máxima em bicicleta com 4 minutos de intervalo entre as séries, frequência semanal de 3

vezes, durante 6 semanas. Foram avaliados por meio de biópsia do vasto lateral os conteúdos de GLUT4, de MCT1, de MCT4, da enzima citocromo oxidase, de ácido graxo translocase (FAT) e da proteína ligadora de ácidos graxos (FABP) antes e após a primeira e a sexta semana de treinamento, bem como, após a primeira e a sexta semana de destreino. Os resultados mostram que o protocolo de treinamento foi efetivo para o desenvolvimento da capacidade oxidativa, uma vez que a citocromo oxidase aumentou sua atividade em 35% após a primeira semana de treinamento e se manteve alta até a sexta semana de treinamento. As proteínas relacionadas ao metabolismo da glicose também sofreram alterações interessantes. O GLUT4 teve aumento de 20% após a primeira semana de treinamento, se mantendo elevado até o fim do período de treinamento. O mesmo comportamento foi verificado no MCT4. Já o MCT1 só teve aumento significativo na sexta semana de treinamento. Como era esperado pelos autores, as proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico não sofreram alterações. Vale destacar ainda que o GLUT4 e a citocromo oxidase se mantiveram com concentrações mais altas que antes do início do treinamento até a sexta semana de destreino. Já o MCT1 e o MCT4 voltaram às concentrações prévias no mesmo período de destreino.

Assim sendo, o treinamento de alta intensidade por 6 semanas foi efetivo para aumentar a capacidade oxidativa, bem como promover adaptações nos MCT's. O aumento expressivo na concentração de MCT4 demonstra o aumento na condição das células de exportar o lactato produzido, o que promove condições metabólicas para manter por mais tempo uma produção energética em intensidade elevada. O aumento do MCT1 demonstra que a condição de retirada do lactato sanguíneo para oxidação nas células, durante o exercício ou a recuperação está aumentada.

Tais apontamentos deixam claro a relação entre a presença dos MCT's e a capacidade oxidativa dos tecidos, uma vez que eles facilitam a manipulação de substratos importantes para a via oxidativa, tais como o piruvato e os íons H^+ .

2.8. MÁXIMA FASE ESTÁVEL DO LACTATO

Como já foi dito, durante a execução de exercícios de alta intensidade ocorre o acúmulo de lactato devido à alta taxa produção em relação às taxas de remoção. Assim sendo, o aumento na demanda energética é proporcional ao aumento das concentrações de lactato intra e extra-celular.

Em resumo, a concentração de lactato é indicativa do consumo de glicogênio, uma vez que essa concentração depende da reação entre NADH^+ e piruvato, catalisada pela enzima LDH, e a quantidade e atividade das lançadeiras de H^+ e transportadores de lactato (MCT).

Toda vez que ocorre aumento na concentração de metabólitos como, cálcio intra-celular, Fosfato Inorgânico (Pi), Adenosina Difosfato (ADP) e Adenosina Monofosfato (AMP), indicadores de aumento na demanda energética, a atividade da enzima fosfofrutoquinase (PFK) também sofre aumento significativo, determinando assim crescimento da glicólise, conseqüentemente, aumento na produção de H^+ e piruvato em quantidades superiores as que as mitocôndrias são capazes de catalizar, formando o ambiente ideal para formação de lactato. Tal situação favorece o aumento nas taxas de geração e redução nas taxas de remoção do lactato (BROOKS, 2000; BROOKS, 2007; BENTLEY et al. 2007).

Nesse sentido, quanto maior a intensidade do exercício, maior a produção de lactato e maior seu acúmulo na musculatura e no sangue.

Por esse motivo a concentração de lactato é comumente utilizada como marcador de intensidade do exercício físico e indicador da alteração da predominância entre os metabolismos aeróbico e anaeróbico (BROOKS, 1985; POWERS & HOWLEY, 2000; GARCIN et al, 2004; BROOKS, 2007).

Muitos índices relacionados à concentração de lactato são utilizados para indicar a intensidade do exercício e o metabolismo energético predominante durante uma determinada atividade. Entre os diversos índices podemos destacar a Máxima Fase Estável do Lactato (MFEL).

A MFEL é definida como a mais alta intensidade de exercício na qual não ocorre acúmulo contínuo do lactato no sangue, ou seja, é a mais alta intensidade onde a estabilização da lactacidemia ainda é observada e mantida

por longos períodos de exercício em decorrência do equilíbrio entre produção e depuração do lactato (BENEKE, 1995; BILLAT et al., 2003).

Diversos autores destacam a utilização da MFEL na avaliação da capacidade aeróbica de atletas (BENEKE, 2003; BILLAT, 2003; SVEDAHL & MACINTOSH, 2003; MANCHADO-GOBATTO, 2007).

Durante muito tempo a MFEL foi estimada pelo início do aumento progressivo e ininterrupto da concentração de lactato no sangue, que em geral, em humanos, ocorre quando a concentração de lactato sanguíneo atinge 4,0mmol/L. Dessa forma, a MFEL era determinada em teste incremental, onde determinava-se a carga de trabalho que correspondesse à 4,0mmol/L de lactato (BILLAT, 2003; SVEDAHL & MACINTOSH, 2003; GOBATTO, 2007).

Entretanto, diversos estudos demonstram que a concentração de lactato sanguíneo que representa a MFEL não se restringe a 4,0mmol/L de lactato, mas que pode variar entre diferentes indivíduos (2-8 mmol/L) (BILLAT et al., 2003). Tais constatações indicavam que a concentração de lactato à 4,0mmol/L não era essencialmente o ponto máximo de equilíbrio entre produção e depuração de lactato.

Assim sendo, o protocolo para determinação da MFEL tem sofrido alterações no sentido de respeitar as características particulares de cada indivíduo. Resumidamente, o protocolo para determinação da MFEL consiste na aplicação de diversas intensidades por períodos de longa duração, realizadas em dias distintos, geralmente separados por 48 horas. Durante a realização de cada teste, em cada carga específica, são coletadas amostras sanguíneas, em geral a cada 5 minutos de realização da atividade. Posteriormente é confeccionada a curva de lactato em cada intensidade e a MFEL é interpretada como a mais alta intensidade de exercício na qual o aumento na concentração de lactato foi igual ou inferior à 1mmol/L a partir do 10º minuto de exercício (BILLAT et al., 2003; BENEKE, 2003; GOBATTO, 2007).

De acordo com Manchado-Gobatto (2007), a vantagem da utilização da MFEL é a possibilidade de identificação individual da transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio.

Nesse sentido, a MFEL vem sendo utilizada não apenas para a avaliação da capacidade aeróbia, mas também para prescrição de treinamento e controle da intensidade do exercício.

Estudos demonstram alguma resposta na concentração de transportadores de lactato após períodos de treinamento em intensidade equivalentes à MFEL (BERGMAN et al., 1999; SUMIDA & DONAVAN, 2001).

De acordo com Bergman et al. (1999) músculos inativos e outros tecidos removem o lactato do sangue durante o exercício abaixo do limiar anaeróbico.

Entretanto, estudo conduzido por Sumida & Donavan (2001) não mostrou aumento na captação de lactato por parte de músculos inativos. No referido estudo, os autores investigaram a influência de 8 semanas de treinamento aeróbico na taxa de remoção do lactato em músculos inativos durante a corrida em esteira e não encontraram diferença significativa na remoção de lactato entre os animais treinados e controle. Contudo, vale destacar que os autores também não encontraram diferença significativa entre os animais treinados e os animais controle, no consumo de O_2 , no consumo de glicogênio ou na produção de CO_2 , o que coloca em dúvida a eficácia do treinamento proposto (corrida de 40-60 minutos, 5 dias por semana durante 8 semanas), desse modo, podendo não mostrar com clareza alterações na captação de lactato por parte de músculos inativos.

Entretanto, em um dos primeiros estudos que investigaram essa questão, Donavan & Pagliassotti (1989) verificaram uma taxa de remoção de lactato duas vezes maior em animais treinados (8 semanas, 1 hora por dia em intensidade equivalente à 75% do VO_{2max}) quando comparados à animais controle. Contudo, os autores conferiram esse aumento na remoção às altas taxas de gliconeogênese e não apenas à oxidação do lactato.

Mais tarde, Baker et al. (1998) investigaram o efeito de dois protocolos de treinamento, um moderado (3 vezes por semana à 21m.min – abaixo da MFEL) e outro intenso (3 vezes por semana à 31m.min) no conteúdo de MCT1 em músculos esqueléticos (Sóleo, EDL e porções branca e vermelha do gastrocnêmio) e no coração de ratos da espécie Sprague-Dawley. Os autores verificaram que o exercício moderado não promoveu alteração no conteúdo de MCT1 dos músculos esqueléticos, já no coração, o mesmo protocolo de exercício promoveu aumento significativo no conteúdo de MCT1. Por outro

lado, o protocolo de exercício intenso promoveu aumento no conteúdo de MCT1 nos músculos sóleo, gastrocnêmio vermelho e coração.

Diversos outros estudos testaram à hipótese de que o treinamento de endurance gera efeito positivo sobre a concentração de transportadores de lactato (PILEGAARD et al., 1993; PILEGAARD et al., 1999a; GREEN et al., 2002; JUEL, 2006; THOMAS et al., 2007; BURGOMASTER et al., 2007).

Todo esse conjunto de estudos reforça a hipótese de que o exercício induz alterações na velocidade de remoção do lactato por meio da modulação na concentração de seus transportadores. Contudo, ainda não é claro o comportamento dessas proteínas em tecidos menos ativos durante o exercício em que a concentração de lactato é mantida estável.

Frente a essa constatação e visto que a hipótese de que o lactato tenha função sinalizadora no organismo a ponto de ter sido chamado por Brooks (2002) como pseudo-hormônio, por estar relacionado com o estímulo a ações regenerativas (anabólicas) (TRABOLD et al., 2003), sugere-se que também possa induzir alterações na expressão de seus transportadores em músculos menos ativos ou mesmo inativos durante uma determinada ação física, o que certamente determinaria a condição da concentração de lactato e consequentemente dos indicadores de desempenho relacionados a ela, tais como limiar de lactato e máxima fase estável o lactato (MFEL).

Entretanto, não existem estudos que avaliem o comportamento da expressão gênica dessas proteínas após sessão aguda ou período de treinamento em músculos pouco ou não ativos.

Nesse sentido, nossa hipótese é que o aumento da lactacidemia induzida pelo exercício pode promover expressão de MCT's em músculos ativos e inativos. Tal resposta explicaria a manutenção da lactacidemia durante exercícios em intensidades equivalentes à máxima fase estável do lactato, por aumentar a participação dos músculos inativos na remoção do lactato.

3 – OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a máxima fase estável do lactato (MFEL) individual em camundongos, bem como, determinar a expressão gênica do MCT1 e do MCT4 no coração, no fígado e em músculos esqueléticos (sóleo, bíceps, e porções branca e vermelha do gastrocnêmio), após uma sessão aguda de natação com volume de 25 minutos ou até exaustão em intensidade equivalente à MFEL. Relacionar a execução de exercício na MFEL com a expressão dos MCT 1 e 4 em músculo ativo e pouco ativo.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Analisar o efeito de uma sessão aguda de natação com volume de 25 minutos ou até exaustão em intensidade equivalente à MFEL sobre a regulação gênica das isoformas de MCT 1 e 4 em músculos esqueléticos ativos e inativos durante a natação, bem como em tecidos consumidores de lactato (fígado e coração) de camundongos.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados para o experimento 26 camundongos (*Mus musculus-Muridae*) machos, com 90 dias de vida e peso de $51,2 \pm 0,9\text{g}$, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – Campus Botucatu.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Biodinâmica da Universidade Estadual Paulista – Campus Rio Claro, alojados em gaiolas coletivas de polietileno (5 animais em cada gaiola) em ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro (não invertido) à temperatura ambiente de 25°C . Receberam ração comercial para roedores (Labina, Purina) e água *ad libitum*.

Todos os experimentos seguiram as resoluções brasileiras específicas de bioética de pesquisa com animais: lei nº 6.638, de 8 de março de 1979 e decreto no 645, de 10 de Julho de 1945.

4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1. ADAPTAÇÃO DOS ANIMAIS AO MEIO LÍQUIDO

Antes de realizar o protocolo experimental (natação contínua em máxima fase estável do lactato até a exaustão), os animais foram adaptados ao meio líquido por um período de 15 dias. Para tanto foi utilizado um cilindro de Poli Cloreto de Vinila (PVC) medindo 20 cm de diâmetro e 60 cm de altura, ergômetro utilizado em todas as fases experimentais. Nos primeiros cinco dias, os animais foram colocados em água rasa (10cm) iniciando com o tempo de 5 minutos e finalizando com 25 minutos (aumento de 5 minutos por dia). Posteriormente, o nível da água foi aumentado, atingindo 50cm de água e 20 minutos de permanência, no décimo terceiro dia. A partir deste momento, os animais iniciaram a adaptação ao incremento de carga, para tal, realizaram o exercício de natação com sacolas de tecido, sem carga, atadas ao dorso para que ocorresse adaptação ao incremento da carga. Nos últimos dois dias da adaptação, o exercício ocorreu com os animais suportando 2% de seu peso corporal por 10 minutos. O propósito de tal procedimento foi reduzir o estresse

promovido pelo contato dos animais ao meio líquido e conseqüentemente minimizar a ação de possíveis interferências extrínsecas nos resultados (GOBATTO et al., 2001; MANCHADO et al., 2006).

Vale destacar que em todos os momentos a temperatura da água foi mantida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.2.2. DETERMINAÇÃO DA MÁXIMA FASE ESTÁVEL DE LACTATO (MFEL) EM EXERCÍCIO CONTÍNUO

A máxima fase estável do lactato (MFEL) foi determinada conforme descrito por Gobatto et al. (2001). Resumidamente, foram realizados 5 testes contínuos de natação (50cm de profundidade) com os animais suportando cargas equivalentes à 3, 4, 5, 6 e 7% do peso corporal, as quais foram acopladas ao dorso dos mesmos por meio de sacolas contendo pesos de metais. O tempo de cada teste foi de 25 minutos de esforço ou até a exaustão, separados por intervalo de 48 horas. As cargas foram distribuídas de forma randômica e nunca repetidas pelo mesmo animal.

Durante cada teste, amostras de sangue (25 μL) provenientes da porção distal da cauda de cada animal foram coletadas por meio de tubos capilares heparinizados, nos intervalos de tempos 5, 10, 15, 20 e 25 minutos e transferidos para tubo microcentrífuga com capacidade de 1,5 ml, contendo 50 μL de fluoreto de sódio à 1% e armazenadas à 8°C para posterior análise da concentração de lactato. Amostras de sangue em repouso de cada animal também foram obtidas.

A determinação da concentração de lactato sangüíneo foi realizada utilizando lactímetro da marca YSI 1500 SPORT (Yellow Spring Inc, EUA). Os valores foram expressos em mmol/L.

A MFEL individual foi interpretada como a mais alta intensidade de exercício na qual o aumento da lactacidemia foi igual ou inferior à 1mmol/L, do 10° ao 25° minuto de esforço.

4.2.3. SESSÃO AGUDA DE EXERCÍCIO EM MEIO LÍQUIDO

Anteriormente ao sacrifício, os animais foram submetidos a uma sessão de exercício de natação suportando cargas atadas ao dorso, em intensidade equivalente à MFEL individual. As condições de temperatura e profundidade da água foram idênticas às adotadas durante os testes supracitados. A sessão aguda de exercício apresentou a duração de 25 minutos ou exaustão.

Logo após a execução desse esforço, os animais foram sacrificados pelo método de decapitação.

4.3. OBTENÇÃO DE TECIDOS

Os animais foram divididos em 3 grupos. Cada grupo de animais (n=6) foi sacrificado em períodos pré-determinados, sendo, imediatamente (G1); 5 horas (G5) e 10 horas (G10) após o término do exercício de natação na MFEL ou até exaustão. Como controle foram utilizados animais com as mesmas características, exceto pelo fato de não terem sido submetidos ao protocolo de adaptação e a sessão de exercício de natação na MFEL (GC n=6).

Vale ressaltar que dos animais submetidos à determinação da MFEL, vinte e quatro animais foram utilizados para análise da expressão gênica.

Os animais foram sacrificados por decapitação e para a obtenção dos músculos sóleo, bíceps e as porções branca e vermelha do gastrocnêmio, a pele da pata foi removida e os músculos localizados e retirados evitando danos aos tecidos. Para obtenção do fígado, o abdômen dos animais foi aberto e então seccionada uma fração do mesmo. Já para a obtenção do coração, rompeu-se o diafragma dos animais e seccionou-se uma fração do órgão. Todos os tecidos foram imediatamente armazenados e mantidos em nitrogênio líquido para posterior análise da expressão gênica. Vale ressaltar que foram retirados os músculos de ambas as patas dos animais.

4.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS MCT's 1 E 4

A determinação da expressão gênica semi-quantitativa dos MCT 1 e 4 envolveram: i) extração do RNA total de cada tecido obtido (coração e fígado,

bem como dos músculos sóleo, bíceps e gastrocnêmio, esse último em suas porções branca e vermelha); ii) síntese do DNA complementar (cDNA); iii) reação em cadeia pela polimerase (PCR). Contudo, antes de realizar a análise da expressão dos genes de interesse foi necessário padronizar número de ciclos da reação em cadeia pela polimerase (PCR), bem como para o gene da β -actina, utilizado para normalizar os dados obtidos. Os procedimentos realizados são descritos a seguir.

4.4.1. DESENHO DAS SEQÜÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhadas utilizando o programa “Gene Runner” versão 3.0, a partir das seqüências dos genes. Essas foram obtidas por meio das informações contidas no banco gênico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) acessado via internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez>). Na tabela 1 podemos observar a seqüências dos iniciadores utilizados, bem como o tamanho dos fragmentos a serem obtidos. O gene da β -actina foi utilizado como gene normalizador das reações (*housekeeping*) por não ter sua regulação alterada pelo exercício físico (Mahoney et al., 2004).

Tabela 1: Seqüências sense e antisense dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho dos fragmentos a serem obtidos e temperatura de anelamento

Gene	Seqüência Sense	Seqüência Antisense	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura (°C)
β -actina	5'-ACA GGC ATT GTC ATG GAC TCC G-3'	5'-TGT CAC CGA TTT CCC TCT C-3'	205	58,2
MCT1*	5'-GTG ACC ATT GTG GAA TGC TGC-3'	5'-GTC TCC TTT GGC TTC TCG TCG-3'	254	57,1
MCT4**	5'-TGC CAT TGG TCT CGT GCT G-3'	5'-TCT GCC TTC AGG AAG TGC TCC-3'	291	58,2

* MCT1: monocarboxylate transporter 1; **MCT4: monocarboxylate transporter 4.

4.4.2. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total foi obtido utilizando-se o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de processador (marca Polytron, modelo PT-MR 2100, Luzernerstrasse, Switzerland) em 1,0 mL de TRIZOL (por 100mg de tecido). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Após a incubação, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio. Novamente as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos, seguido de centrifugação a 12000g por 15 minutos, à temperatura de 4°C onde formaram-se 3 fases: a superior, aquosa e incolor, que continha o RNA; a intermediária esbranquiçada que continha o DNA, e a inferior vermelha que continha proteínas e restos celulares. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga (1,5 mL) e precipitada pela adição de 0,5 mL de isopropanol gelado, incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugação a 12000g por 10 minutos à 4°C. Na seqüência, o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 1mL de etanol 70%, homogeneizado e uma nova centrifugação de 5 minutos a 7000g à 4°C foi realizada. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e o RNA seco à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. Após a secagem, o RNA foi ressuspenseo em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). O volume de água DEPC utilizado variou de acordo com o tamanho do sedimento obtido (Verlengia, 2003 a,b).

4.4.3. QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL EXTRAÍDO

A quantificação do RNA foi realizada em duplicata diluindo 100x as amostras em água isenta de RNase. A absorbância da amostra foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Para a quantificação do RNA considerou-se 1 OD_(260nm) referente a 40µg de RNA. Para a análise da pureza do RNA, o valor da absorbância

obtido a 260nm foi dividido pelo obtido a 280nm e a amostra apresentou relação 260/280 igual a 1,8, o que é considerado confiável, indicando alto grau de pureza (Sambrook et al., 1989).

4.4.4. VERIFICAÇÃO DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO

A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,2% desnaturante (formaldeído 37%) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, em tampão MOPS [3- ácido propanesulfônico (N-morfolino)]. A separação eletroforética foi realizada a 90V por 1 hora e visibilizados em luz ultravioleta em transluminador (Chemi System, UVP Bioluminescence systems, Uppsala, Suécia) (Sambrook, et al., 1989). Os resultados foram foto-documentados por meio do aparelho Kodak® Digital Science DC120 Zoom Digital Camera (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EUA) sendo a imagem processada e analisada utilizando o software da Kodak Digital Science 1D Image Analysis (Gibico-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EUA).

Na figura 11, observa-se o perfil do RNA total após separação eletroforética em gel de agarose 1,2% desnaturante. Nota-se a presença das bandas 28S de 18S com tamanhos de 4.872bp e 1872 bp, respectivamente, referentes às subunidades do RNA ribossomal (subunidade maior e subunidade menor). A presença da maior intensidade em uma proporção equivalente a 2:1 da subunidade maior em relação à subunidade menor demonstra a integridade do RNA total obtido.

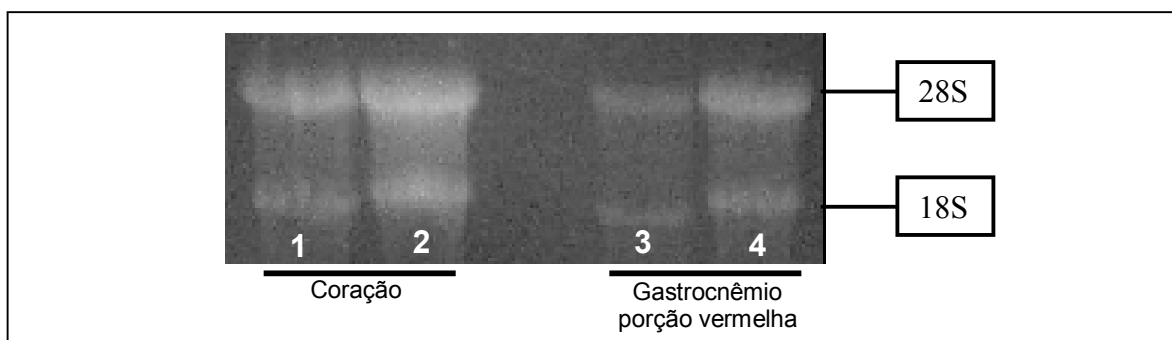


Figura 11. Foto digitalizada do gel de agarose 1,2% desnaturante (formaldeído 37%) após separação eletroforética do RNA total extraído a partir do coração e da porção vermelha do músculo gastrocnêmico, utilizando o reagente TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Linhas 1 e 2 RNA extraído do coração ; e Linhas 3 e 4 RNA extraído da porção vermelha do gastrocnêmio.

4.4.5. SÍNTESE DE cDNA - REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1µg de RNA total extraído das amostras conforme descrito anteriormente (item 3.4.2. da metodologia). A síntese do cDNA foi realizada utilizando a seguinte mistura de reagentes: 1µL de oligonucleotídeos randômicos (146ng), 1µL da enzima transcriptase reversa (ImProm™ II Reverse Transcriptase Promega), tampão da enzima [Tris-HCl a 50 mM (pH 8.0), KCL 75 mM, MgCl₂ 3mM, DTT a 5 mM], 1µL da mistura de dNTPs (ATP, CTP, GTP, TTP) a 500 µM e água DEPC para completar 25µL. As reações foram incubadas por 5 min a 25°C para permitir a hibridização dos oligonucleotídeos randômicos ao RNA, seguida de aquecimento a 42°C por 60 min para permitir a formação da fita complementar ao RNA, ou seja a síntese do cDNA e reaquecida à 70°C durante 15 min para inativação dos reagentes. O cDNA, assim obtido, foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Na figura 12 observa-se o perfil eletroforético de cDNA obtido após separação eletroforética em gel de agarose 1,5%. Nota-se a presença de um arraste iniciando próximo ao poço de aplicação e estendendo para a parte inferior do gel, resultado da formação de diferentes fragmentos de cDNA correspondentes ao mais variados tipos de RNA presentes na amostras, as quais tiveram suas seqüências reconhecidas de modo randômico devido ao emprego de oligonucleotídeos randômicos.

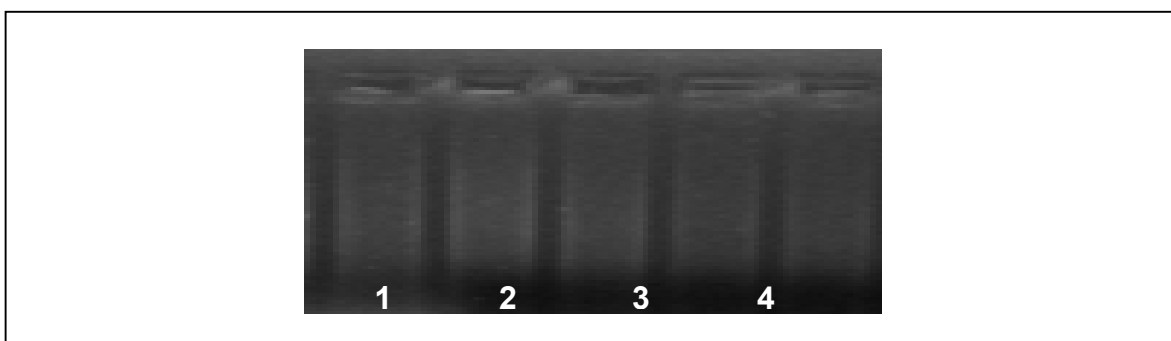


Figura 12. Foto digitalizada do gel de agarose 1,5% após separação eletroforética do do cDNA obtido a partir do RNA total dos tecidos analisados. Linha 1 Coração; Linha 2 Fígado; Linha 3 porção vermelha do gastrocnêmio; Linha 4 porção branca do músculo gastrocnêmio; Linha 5 músculo bíceps.

4.4.6. PROCESSAMENTO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As reações em cadeia pela polimerase foram realizadas para cada grupo de oligonucleotídeos iniciadores, todos os parâmetros foram avaliados utilizando concentrações constantes dos reagentes, a saber: 200 mM de cada *primer*, 200 μ M de cada desoxirribonucleotídeo, 2U de DNA polimerase (GoTaq -Promega); tampão da PCR contendo: Tris-HCl a 75 mM (pH 9,0), KCl a 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20Mm e 2 mM de MgCl₂. A reação da PCR foi realizada em um volume final de 12,5 μ L e processadas no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Alemanha).

Os cDNAs foram amplificados em ciclos compostas de três fases: desnaturação do cDNA molde à 90°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores em temperatura específica para cada *primer* (Tabela 1) por 30 segundos, e extensão à 72°C por 30 segundos, momento em que a DNA polimerase incorpora os dNTPs livres presentes na reação ao longo da fita molde. O número de ciclos utilizado para avaliar cada gene em cada tecido foi determinado como descrito a seguir. Vale ressaltar que antes das amostras passarem pelos ciclos, cujas fases estão descritas acima, eles foram submetidos à um período de 2 minutos à 90°C para que ocorresse uma desnaturação inicial completa do cDNA.

Os produtos amplificados pela reação de PCR foram avaliados por meio da separação eletroforética em gel de agarose a 1,5% contendo brometo de etídeo a 0,5 μ g/mL e visibilizados em luz ultravioleta no transluminador (Epi Chemi II Darkroom – UVP Bioimaging System, Upland, CA, Estados Unidos).

A foto-documentação dos produtos amplificados foram realizadas por meio do aparelho Kodak[®] Digital Science DC120 Zoom Digital Câmera (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc, Gaithersburg, MD, Estados Unidos), sendo a imagem processada e analisada por meio do software da Kodak Digital Science 1D Image Analysis (Gibco-BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, Estados Unidos). A análise densitométrica das imagens obtidas foi realizada através do software Scion Image for Windows[®] beta 4.0.2 (Scion Corporation, Frederick, Maryland , Estados Unidos – www.scioncorp.com).

4.4.7. PADRONIZAÇÃO DO NÚMERO DE CICLOS DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA OS GENES EM ESTUDO.

A PCR sistematiza um processo biológico, similarmente aos processos *in vivo* a eficiência da reação é menor que 100% (eficiência relativa). Este aspecto é de extrema importância para as análises de quantificação dos ácidos nucléicos. Neste contexto, o termo “eficiência relativa da PCR” é utilizado para descrever a eficiência total (*overall*) do processo de amplificação avaliado ao longo do número total de ciclos da PCR.

Nos ciclos iniciais, onde o número de moléculas alvo disponíveis é relativamente baixo em comparação com o número total da população de ácido nucléico na mistura, a eficiência da PCR é baixa. Similarmente, nos últimos ciclos quando o número de produtos de amplificação é muito alto e a concentração de iniciadores não hibridados é limitada, a amplificação esperada da PCR também é de baixa eficiência. Assim, a amplificação da PCR é mais eficiente durante os ciclos intermediários do processo, intervalo em que existe uma significativa disponibilidade de moléculas alvo, iniciadores, enzimas e dNTPs entre outros, resultando na síntese exponencial de novas moléculas do produto da PCR. Dessa forma, quando o objetivo da análise é a quantificação e/ou a semi-quantificação é necessário avaliar a eficiência relativa da PCR.

Assim, para a determinação do ciclo de amplificação, foi realizada uma cinética de 9 ciclos de amplificações, iniciado no ciclo de número 22 e finalizada no ciclo de número 46 com intervalos de 3 ciclos entre cada interrupção da amplificação por meio da retirada dos tubos de reação do termociclador. Ao final de cada ciclo desejado, o tubo correspondente era retirado do aparelho e mantido a 4°C até sua utilização. Na seqüência as reações foram submetidas à separação eletroforética em gel de agarose 1,2 % contendo 0,5 µg/mL brometo de etídio, fotografados e as densidades ópticas das bandas obtidas por meio do software Scion Image for Windows® beta 4.0.2 (Scion Corporation, Frederick, Maryland, Estados Unidos – www.scioncorp.com).

A padronização do número de ciclos para os diferentes genes avaliados (MTC 1, MTC 4 e β -actina) foram realizadas para cada tecido de interesse (coração, fígado, porção vermelha e porção branca do gastrocnêmio, sóleo e

bíceps) obtidas de animais controles. Pode-se observar nos anexos 1, 2 e 3 a representação gráfica dos valores densitométricos obtidos ao longo dos ciclos de amplificação, bem como o perfil eletroforético do produto de reação dos genes MTC1, MTC4 e β -actina, respectivamente.

Para o presente estudo foi considerado como ideal para determinação da expressão gênica os números de ciclos localizados entre 60% a 80% do ponto de saturação.

Na Tabela 2 estão apresentados as condições padronizadas para os genes das proteínas transportadoras (MCT1 e MCT4) e para o gene *housekeeping* (β -actina) avaliadas nos tecidos de camundongos.

Tabela 2: Condições padronizadas para avaliação da expressão gênica dos genes de estudo em tecidos de camundongos.

Gene	Tecido	Ciclos de Amplificação	Temperatura (°C)
MCT1	Coração	34	57,1
	Fígado	32	
	Porção Vermelha do gastrocnêmio	34	
	Porção Branca do gastrocnêmio	35	
	Sóleo	37	
	Biceps	35	
MCT4	Coração	34	58,2
	Fígado	37	
	Porção Vermelha do gastrocnêmio	34	
	Porção Branca do gastrocnêmio	34	
	Sóleo	37	
	Biceps	34	
B-actina	Coração	30	58,2
	Fígado	34	
	Porção Vermelha do gastrocnêmio	32	
	Porção Branca do gastrocnêmio	32	
	Sóleo	34	
	Biceps	34	

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio da utilização do Software GraphPad Prism, Versão 4.0 (Graphpad software, Inc, USA).

O teste “F” foi utilizado na checagem da homocedasticidade, seguido da análise de variância ANOVA com checagem de significância entre os grupos pelo método de *Tukey*, sendo considerado como significativo $p \leq 0,05$.

Os dados foram apresentados em média e erro padrão da média na forma de gráficos e tabelas.

5 – RESULTADOS

5.1. DETERMINAÇÃO DA MFEL

Na tabela 3 é possível observar os valores da lactacidemia para todas as cargas e em todos os momentos aferidos durante o teste de MFEL.

Como era esperado, observa-se uma relação entre o aumento da lactacidemia e o aumento da carga de exercício. A concentração de lactato sanguíneo atingiu $5,36 \pm 0,55$ mmol/L; $5,63 \pm 0,36$ mmol/L; $6,03 \pm 0,46$ mmol/L; $7,16 \pm 0,55$ mmol/L; e $8,44 \pm 0,48$ mmol/L para as cargas de 3, 4, 5, 6 e 7% do PC respectivamente (Tabela 3).

Essa relação entre intensidade de esforço e lactacidemia também pode ser observada na representação gráfica exposta na Figura 13.

Tabela 3: Lactacidemia dos camundongos nos períodos antes e durante (5, 10, 15, 20 e 25 minutos) do teste de MFEL em diferentes intensidades de natação (Carga - %PC). Valores expressos em média e erro padrão(\pm).

Carga (%PC)	Concentração de Lactato Sanguíneo (mmol/L)					
	Tempo (minutos)					
	0	5	10	15	20	25
3,0	$1,80 \pm 0,11$	$4,56 \pm 0,36$	$5,09 \pm 0,23$	$4,90 \pm 0,34$	$4,80 \pm 0,31$	$5,36 \pm 0,55$
4,0	$2,33 \pm 0,24$	$5,81 \pm 0,67$	$6,31 \pm 0,52$	$6,60 \pm 0,68$	$5,83 \pm 0,41$	$5,63 \pm 0,36$
5,0	$2,74 \pm 0,28$	$5,57 \pm 0,34$	$6,20 \pm 0,30$	$5,76 \pm 0,35$	$6,46 \pm 0,36$	$6,03 \pm 0,46$
6,0	$2,90 \pm 0,33$	$6,49 \pm 0,57$	$6,15 \pm 0,56$	$6,25 \pm 0,44$	$6,37 \pm 0,53$	$7,16 \pm 0,55$
7,0	$2,75 \pm 0,33$	$7,06 \pm 0,61$	$7,07 \pm 0,48$	$7,35 \pm 0,27$	$8,37 \pm 0,36$	$8,44 \pm 0,48$

A quantidade dos animais que atingiram a MFEL em cada carga avaliada, bem como, sua representação % e média da concentração de lactato no momento da estabilização para cada carga podem ser observados expressos na tabela 4.

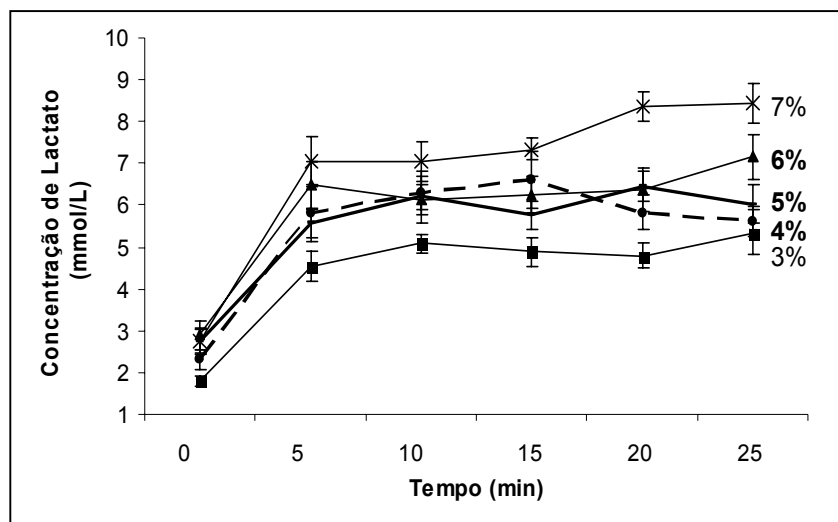


FIGURA 13. Determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL) em camundongos submetidos aleatoriamente em 5 cargas de nado determinadas pelo percentual do peso corporal (3, 4, 5, 6 e 7%). A MFEL foi considerada a mais alta intensidade na qual se obteve estabilização lactacidêmica. Valores expressos em média e \pm erro padrão da média $n=26$

Como pode-se observar, a maior parte (34,6%) dos animais atingiram a MFEL em intensidade equivalente à 4% do PC a uma lactacidemia de $5,78 \pm 0,29$ mmol/L. Contudo, devido a variabilidade que pode ocorrer na estabilização do lactato em diferentes indivíduos, ainda verificamos animais com MFEL em intensidade equivalente a 3% do PC (19,2% dos animais com lactacidemia de $4,40 \pm 0,21$ mmol/L); equivalente a 5% do PC (15,3% dos animais com lactacidemia de $4,98 \pm 0,26$ mmol/L); equivalente a 6% do PC (19,2% dos animais com lactacidemia de $5,44 \pm 0,21$ mmol/L); e intensidade equivalente a 7% do PC (7,6% dos animais com lactacidemia de $6,67 \pm 0,29$ mmol/L).

Tabela 4: Número de animais que atingiram a MFEL em cada intensidade, expressos em valores absolutos e percentuais e a média da lactacidemia de estabilização.

Carga (%PC)	Número de Animais que atingiram a MFEL	%	Lactacidemia de Estabilização
< 3%	1	3,8	--
3%	5	19,2	$4,40 \pm 0,21$
4%	9	34,6	$5,78 \pm 0,29$
5%	4	15,3	$4,98 \pm 0,26$
6%	5	19,2	$5,44 \pm 0,21$
7%	2	7,6	$6,67 \pm 0,29$

5.2. EXPRESSÃO DO GENE MCT1 EM DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS APÓS SESSÃO DE NATAÇÃO NA MÁXIMA FASE ESTÁVEL DE LACTATO.

Os dados da expressão gênica do MCT1 obtido a partir dos diferentes tecidos avaliados (Coração, Fígado, gastrocnêmio porção branca e vermelha, sóleo e bíceps) podem ser observados na Figura 14 a-f.

Os dados de expressão do MCT1 obtidos a partir das análises do tecido do coração não mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparado os períodos Imediato, 5 e 10 horas com o controle (Figura 14-a).

Em uma análise intra-ensaio foi possível observar aumento estatisticamente significativo de 31,6% quando comparado 10 horas com o intervalo imediato.

No fígado, aumento significativo de 39% na expressão do MCT1 foi observado 10 horas após o término do exercício de natação na máxima fase estável do lactato quando comparado com o grupo controle e os períodos Imediato e 5 horas. (Figura 14-b).

A expressão gênica do MCT1 na porção vermelha do músculo gastrocnêmico não mostrou ser influenciada pelo exercício de natação na máxima fase estável do lactato (Figura 14-c).

Por outro lado, os dados obtidos da porção branca, mostraram um pico significativo na expressão desse gene imediatamente após o exercício (62,3%) quando comparado com o grupo controle, bem como quando comparado aos grupos 5 e 10 horas pós exercício (61,4% 57,9%, respectivamente). Após esse momento não foram encontradas diferenças significativas em relação ao controle (Figura 14-d).

No músculo sóleo o tratamento estatístico indicou diferença significativa na expressão gênica do MCT1 imediatamente após o exercício, diferença que se manteve em todos os períodos em relação ao controle (Figura 14-e). Observa-se aumento expressivo de 202,1% imediatamente após o exercício, 227,3% 5 horas após e 230% 10 horas após o exercício, sempre em relação ao controle.

A expressão gênica do MCT1 no músculo bíceps parece não ser influenciada pelo exercício de natação na máxima fase estável do lactato

(Figura 14-f). Não foi identificada nenhuma diferença estatisticamente significativa nos períodos estudados. Contudo, observou-se tendência de aumento imediatamente e 10 horas após o exercício (16,2% e 25,2%, respectivamente) na expressão desse gene nos períodos imediatamente, 5 e 10 horas após o término do exercício.

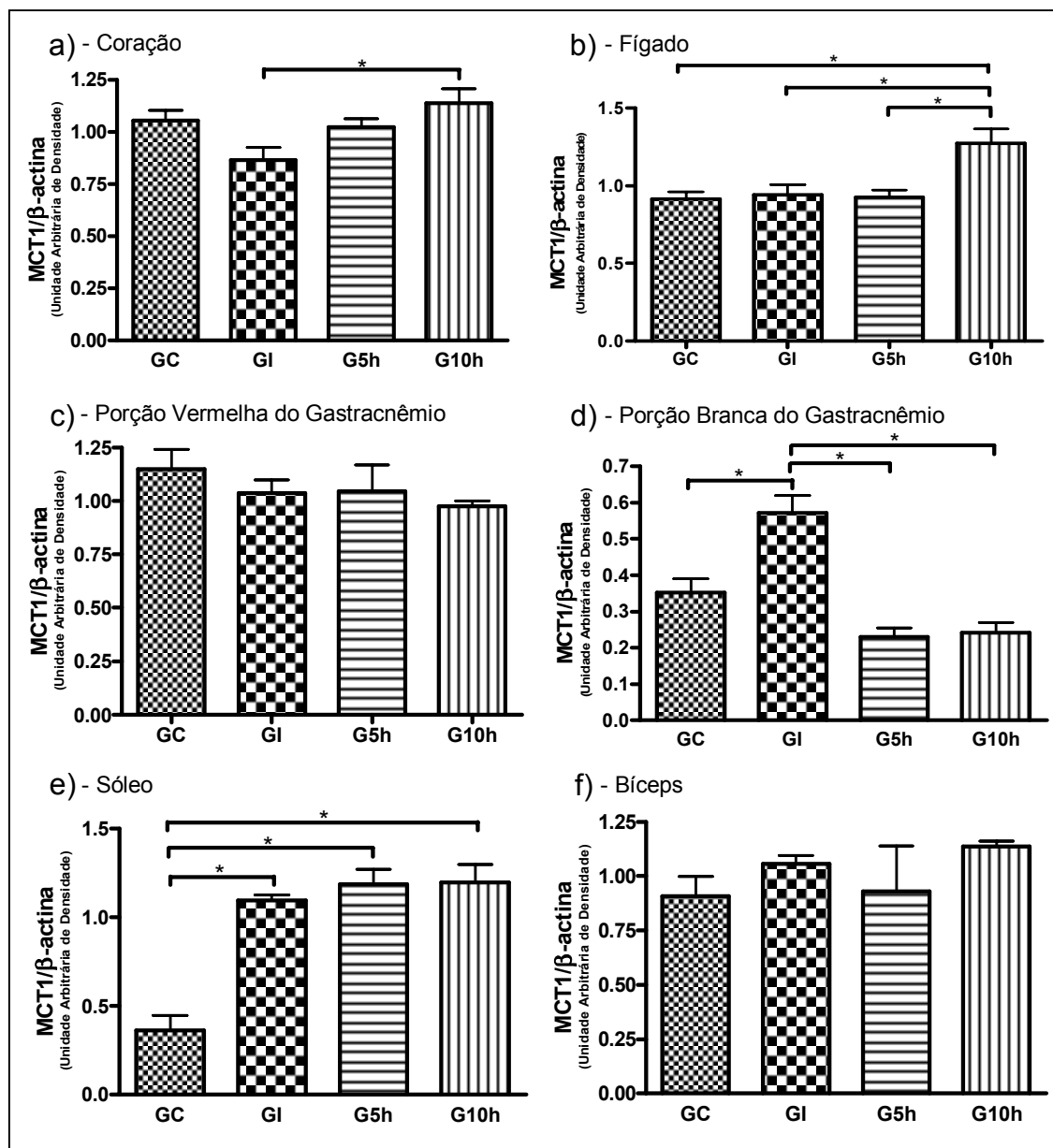


Figura 14. Determinação da expressão gênica do MCT1 em diferentes tecidos. a) Coração; b) Fígado; c) Gastrocnêmio porção vermelha; d) Gastrocnêmio porção branca; e) Sóleo; e f) Bíceps de camundongos submetidos a exercício de natação na máxima fase estável do lactato. Os dados representam a média e o erro padrão de dois experimentos em duplicata de cada grupo específico com n de 6 animais. O símbolo * indica $p \leq 0,05$ entre os grupos indicados.

5.3. EXPRESSÃO DO GENE MCT4 EM DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS APÓS SESSÃO DE NATAÇÃO NA MÁXIMA FASE ESTÁVEL DO LACTATO.

Na figura 15a-f, observamos os dados da expressão gênica do MCT4 nos tecidos estudados (coração, fígado, gastrocnêmio porção vermelha e branca, sóleo e bíceps).

A expressão gênica do MCT4 no coração sofreu redução significativa de 28,2%; 35,5% e 38,3% para os períodos imediatamente, 5 e 10 horas após o exercício quando comparados com o grupo controle (Figura 15-a). Vale ressaltar ainda, que foi possível observar redução significativa de -14% entre os períodos imediatamente e 10 horas após o exercício.

Já no fígado, não foi observada diferença significativa entre os períodos de análise nesse tecido (Figura 15-b).

O mesmo foi observado na porção vermelha do músculo gastrocnêmico, onde a expressão do MCT4 não mostrou ser influenciada pelo exercício de natação na máxima fase estável de lactato (Figura 15-c). Pequenas alterações foram identificadas, mostrando tendência à manutenção (-4,5%; 2,2% e -6,5% imediatamente, 5 e 10 horas após o exercício).

Em relação à porção branca do músculo gastrocnêmio, redução significativa (34,1%) foi observada no período de 5 horas após o término do exercício de natação quando comparado com o grupo controle (Figura 15-d). Entretanto, os demais períodos estudados não indicaram outras alterações significativas na expressão desse gene (-0,3%, -11,5%, imediatamente e 10 horas respectivamente).

Os dados de expressão do MCT4 obtidos a partir das análises do tecido no músculo sóleo mostraram dois picos significativos de expressão, imediatamente após (82%) e 10 horas após (55,9%) o exercício em relação ao controle. Contudo não foi observada diferença significativa entre o controle e 5 horas após o exercício (Figura 15-e).

Por outro lado, a expressão gênica do MCT4 no músculo bíceps parece não ser influenciada pelo exercício de natação na máxima fase estável do lactato (Figura 15-f). Não foi identificada nenhuma diferença significativa nos períodos estudados. Contudo, observou-se aumento de 40,9%, 28,6% e 35,6%

nos períodos imediatamente, 5 e 10 horas após o término do exercício, respectivamente.

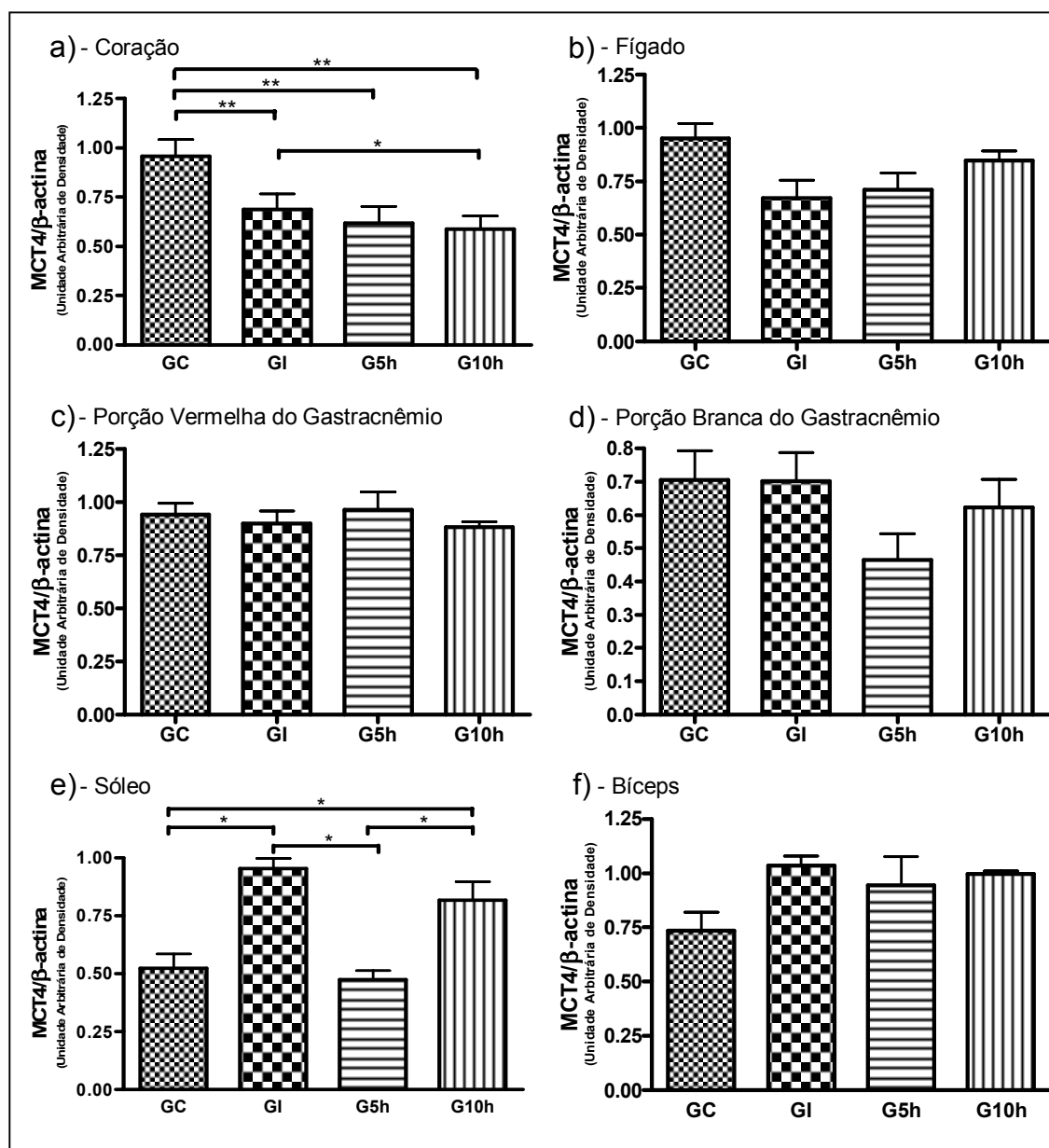


Figura 15. Determinação da expressão gênica do MCT4 em diferentes tecidos. a) Coração; b) Fígado; c) Gastrocnêmio porção vermelha; d) Gastrocnêmio porção branca; e) Sóleo; e f) Bíceps de camundongos submetidos a exercício de natação na máxima fase estável do lactato. Os dados representam a média e o erro padrão de dois experimentos em duplicata de cada grupo específico com n de 6 animais. O símbolo * indica $p \leq 0,05$ entre os grupos indicados.

6 – DISCUSSÃO

A MFEL é considerada a mais alta concentração sanguínea de lactato durante o exercício com cargas constantes, na qual a entrada do lactato na circulação é igual à remoção, sendo um importante indicador da capacidade aeróbia (HECK et al., 1985; BENEKE et al., 2001). Em humanos, a concentração de lactato correspondente a MFEL é de aproximadamente 4mmol/L podendo ter significativas variações entre sujeitos (BILLAT et al., 2003). Em ratos *Wistar*, o valor de lactato na MFEL determinada em corrida na esteira rolante foi semelhante ao encontrado em humanos (PILIS et al., 1993; MANCHADO et al., 2006). Diferentemente, em exercício de natação, nesses animais a concentração de lactato foi de aproximadamente 5,5 mmol/L, mantendo-se inalterada após 8 semanas de treinamento (GOBATTO et al., 2001; DE ARAUJO et al., 2007).

Em camundongos, a concentração de MFEL determinada em corrida na esteira também se manteve após treinamento, porém, atingindo valores inferiores de estabilização (3 mmol/L) em relação aos encontrados com ratos *Wistars* (FERREIRA et al., 2007). Contudo, esses valores lactacidêmicos de MFEL parecem ser dependentes do tipo de exercício, uma vez que encontramos no presente estudo valores de aproximadamente 5,5 mmol/L de lactato em exercício de natação (Tabela 3 e 4 e Figura 13). Manchado et al. (2006) já haviam relatado o efeito do ergômetro na determinação da MFEL em protocolos envolvendo natação e corrida em ratos *Wistars*. Essas variações na concentração de lactato para cada protocolo de exercício pode levar a hipótese que a manutenção da lactacidemia na MFEL ocorra supostamente pela alta participação da musculatura menos ativa na oxidação do lactato, hipótese avaliada por nós no presente estudo. Contudo, nossos dados indicam não haver diferenças estatísticas entre os valores de expressão gênica do MTC1 e 4 na musculatura do bíceps (tecido pouco ativo) (Figura 14-f e 15-f), não suportando essa hipótese. Porém, as análises mostram uma tendência de aumento na expressão de MTC1 na ordem de 16,2% e 25,2% (Imediatamente e 10horas após o exercício respectivamente) e para o MTC4 de 40,9%, 28,6% e 35,6%(Imediatamente, 5horas e 10horas após o exercício respectivamente). Considerando que este trabalho é o primeiro que investigou resposta da

expressão gênica de MCT's em tecidos pouco ativos, outros estudos fazem-se necessários para melhor caracterizar essa resposta (hipótese), como análises de períodos mais prolongados em relação ao término do exercício, uma vez que a cinética de expressão gênica apresenta variável entre os estudos em relação aos tecidos ativos (GREEN et al., 2002; COLES et al., 2004), e inclusão de análises de síntese de proteínas dos MCT's (GREEN et al., 2002; COLES et al., 2004; MESSONIER et al., 2007).

Por outro lado, Beneke et al. (1995) verificaram diferenças entre as concentrações de lactato na MFEL obtidas em exercícios envolvendo diferentes grupos musculares, observando que quanto maior a massa muscular envolvida no exercício, menor foi a lactacidemia de estabilização na MFEL. No entanto, no exercício de natação para ratos essa teoria não parece ser válida, pois mesmo envolvendo maior massa muscular, a concentração de lactato na MFEL se mantém elevada na natação em comparação ao exercício de corrida (MANCHADO et al., 2006). Desse modo, a idéia inicial que os músculos menos ativos possam exercer papel fundamental no máximo equilíbrio entre a produção e remoção de lactato em condição de MFEL parece não ter sido constatada em nosso estudo, ao menos pelo comportamento inalterado da expressão gênica dos MCT1 e MCT4 no bíceps, músculo menos ativo durante a natação. Em contraste, esses resultados podem indicar que a concentração de estabilização do lactato na natação se mantém em níveis mais elevados em relação a exercício de corrida devido à baixa participação da musculatura pouco ativa no exercício de MFEL, removendo menos esse metabólito (FERREIRA et al., 2007).

Desse modo, foi esperado que as maiores alterações na expressão gênica ocorressem nas fibras musculares ativas do tipo I devido à predominância aeróbia do exercício. Sendo assim, o músculo sóleo foi o que mais expressou MCT1 em relação ao grupo controle mesmo após 10 horas do exercício na intensidade de MFEL (Figura 14-a) demonstrando sua alta correlação com a capacidade oxidativa (ARMSTRONG AND PHELPS, 1984; BONEN et al., 2000). A expressão do MCT4 mesmo sendo correlacionada com as fibras de contração rápida, no músculo sóleo também foi aumentada imediatamente após o exercício e após 10 horas (Figura 15-e). Isso mostra que as expressões gênicas dos MCT1 e MCT4 no músculo sóleo são as que mais

revelam adaptações agudas, provavelmente por efeito do aumento tanto do influxo quanto do efluxo de lactato durante exercício de natação em MFEL. Distintamente, a porção vermelha do músculo gastrocnêmio não revelou resposta semelhante no exercício de natação.

Já a maior expressão gênica do MCT1 na porção branca do gastrocnêmio imediatamente após o exercício foi surpreendente (Figura 14-c). Esses valores demonstram que em exercícios na MFEL no qual se utiliza predominantemente a via energética aeróbia também se torna necessário o aumento da expressão do MCT1 na musculatura do tipo II. Considerando que a expressão dos MCTs possa ser controlada pela acidose, a concentração de lactato no exercício em MFEL (5,5 mmol/L) pode indicar adaptações na expressão gênica também em transportador oxidativo (MCT1), independente da musculatura, devido ao seu *K_m* entre 3-5 mmol/L (TONOCHI et al., 2002). Parece que a regulação da expressão gênica do MCT1 ocorre pela intensidade do esforço, independente da característica da fibra. No entanto, não se sabe qual o nível de ação do MCT1 em fibras do tipo II, pois esses transportadores podem ser expressos não exercendo uma atividade efetiva pelo baixo *K_m* atingido durante o exercício em MFEL (THOMAS et al., 2005).

No coração, o lactato é utilizado como um importante substrato energético sendo transportado para o miócito cardíaco para sofrer oxidação. Durante o exercício em geral, devido ao aumento do fluxo sanguíneo no coração, a extração do lactato pelo miocárdio aumenta para oxidá-lo a CO₂ (STANLEY, 1991). Em contraste, o lactato também pode ser transportado para fora da célula cardíaca para evitar acidificação em situações na qual exista alta produção (STANLEY, 1991). Para isso, um sistema trans-membrana (MCT) eficiente torna-se de extrema importância para controlar a entrada e saída do lactato no miocárdio. No entanto, a não alteração da expressão gênica no MCT1 nesse estudo (Figura 14-a) pode indicar uma baixa necessidade do miocárdio em expressar MTC1 em períodos mais curtos (imediatamente e 5 horas após o exercício), provavelmente por se tratar de um órgão altamente especializado em oxidar o lactato (BONEN et al., 2006).

De fato, Eydoux et al. (2000) encontraram aumento no conteúdo de MCT1 em tecido cardíaco de ratos Wistar após 5 semanas de treinamento em esteira (1hora/dia, 5dias/semana, 25m/min, Inclinação de 10%). No referido

estudo os autores compararam o conteúdo de MCT1 de animais controle (sedentários), animais sedentários adaptados submetidos à exercício agudo (25m.min, Inclinação de 10% até exaustão) e animais treinados durante cinco semanas. Os dados produzidos demonstram aumento de 33% no conteúdo de MCT1 no miocárdio dos animais treinados, contudo, não foi identificado nenhuma alteração no conteúdo desse transportador nos animais não treinados que foram submetidos ao exercício agudo.

Hashimoto et al. (2004) investigaram o conteúdo de MCT1 no miocárdio após treinamento em ratos enfardados e produziram resultados semelhantes, ou seja, observaram aumento no conteúdo dessa proteína após 6 semanas de treinamento em esteira rolante (10m.min, 60min/dia, 5dias/semana). Tais apontamentos corroboram a hipótese de que exista baixa necessidade do miocárdio em expressar MCT1 em períodos curtos, exatamente por se tratar de tecido com alta capacidade oxidativa.

Em relação ao MCT4 no miocárdio, estudos anteriores mostraram que o coração de ratos não expressa esse transportador (BONEN, 2000; BONEN et al., 2006). Contudo, além de termos observado tal expressão no músculo cardíaco de camundongos, a diminuição da expressão gênica do MCT4 nesse tecido ao longo de 10 horas (Figura 15-a) pode evidenciar a baixa necessidade de ação desse transportador na condução do lactato para fora da fibra cardíaca principalmente após exercício na intensidade de MFEL, desviando a necessidade de aumento da expressão para o MCT1.

Além da expressão dos MCT1 e MCT4 principalmente na musculatura esquelética e cardíaca, diversos estudos têm investigado o transporte de monocarboxilados em células de hepatócitos (HALESTRAP et al., 1997; HALESTRAP & MEREDITH, 2004). Messonnier et al. (2007), relataram que exercício de moderada intensidade possibilita uma eficiente entrada e saída do lactato entre as células utilizando-o como substrato energético no fígado pela neoglicogênese. No entanto, a expressão do MCT1 imediatamente após o exercício não se alterou nesse tecido, mostrando que a expressão desse transportador necessita ser aumentada após 10 horas de exercício na MFEL (Figura 14-b). Como durante o exercício aeróbio a ação do MCT1 é mais efetiva, a sinalização para expressão desse transportador ocorre tardiamente (10 horas após o exercício).

Em resumo, a concentração de lactato obtida durante o exercício moderado em intensidade de MFEL não promoveu aumento significativo na expressão de MCT1 e MCT4 na musculatura pouca ativa do bíceps. Contudo, diante dos dados obtidos podemos sugerir que a manutenção da lactacidemia nessa intensidade de esforço pode ser controlada principalmente pela ação dos MCT1 no músculo sóleo e no coração. Desse modo, são necessários mais estudos que determinem a expressão gênica dos MCT1 e MCT4 em outras intensidades de exercício bem como em outros ergômetros, para verificar a influência da lactacidemia sobre a massa muscular envolvida. Outro aspecto importante, é que a cinética de expressão do MCT1 nos tecidos consumidores de lactato ocorre tardiamente (10 horas), mostrando uma adaptação natural destes tecidos a longo prazo em comparação aos tecidos ativos no qual a resposta parece ser imediata.

7 – CONCLUSÃO

O presente estudo levou às seguintes conclusões:

1. A determinação da MFEL em camundongos durante exercício de natação mostrou que, nesse modelo de exercício, os valores lactacidêmicos ficam em torno de 5,5 mmol/L de lactato.
2. A cinética de expressão do MCT1 nos tecidos consumidores de lactato (coração e fígado) ocorre tardiamente (10 horas), mostrando uma adaptação a longo prazo destes tecidos em relação aos tecidos ativos, os quais demonstram uma resposta imediata na regulação da expressão gênica.
3. O exercício em MFEL não induziu alterações significativas na expressão gênica de MCT1 ou MCT4 nos tecidos pouco ativos (músculo bíceps).
4. Em tecidos ativos, o exercício de predominância aeróbica promove adaptações agudas na expressão principalmente do MCT1 tanto em tecidos com predominância de fibras tipo I (Sóleo) quanto em tecidos com predominância de fibras tipo II (porção branca do gastrocnêmio);
5. A lactacidemia induzida pelo exercício proposto promove expressão aguda de MCT4 no músculo Sóleo.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ARMSTRONG, R.B; PHELPS, R.O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. **Am J Anat.** v. 171, n. 3, p.259-272, 1984.

BAKER, S.K.; McCULLAGH, K.J.; BONEN, A. Training intensity-dependent and tissue-specific increases in lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle. **J Appl Physiol.** v. 84, n. 3, p. 987-994, 1998.

BENEKE, R. Anaerobic threshold, individual anaerobic threshold, and maximal lactate steady state in rowing. **Med Sci Sports Exerc.** v. 27, n. 6, p. 863-867, 1995.

BENEKE, R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. **Eur J Appl Physiol.** v. 89, n. 1, p. 95-99, 2003.

BENEKE, R.; LEITHAUSER, R.; HUTLER, M. Dependence of the maximal lactate steady state on the motor pattern of exercise. **British Journal of Sports Medicine,** v.35, p.192-196, 2001.

BENTLEY, D.J.; NEWELL, J.; BISHOP, D. Incremental exercise test design and analysis: implications for performance diagnostics in endurance athletes. **Sports Med.** v. 37, n. 7, p 575-586, 2007.

BERGERSEN, L Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. **Neuroscience.** v. 145, n. 1, p. 11-19, 2007.

BERGERSEN, L.; RAFIKI, A.; OTTERSEN, O.P. Immunogold cytochemistry identifies specialized membrane domains for monocarboxylate transport in the central nervous system. **Neurochem Res.** v. 27, n. 1-2, p. 89-96, 2002.

* Referências ABNT 6023/2002

BERGMAN, B.C.; WOLFEL, E.E.; BUTTERFIELD, G.E.; LOPASHUCK, G.D.; HORNING, M.A.; BROOKS, G.A. Active muscle and whole body lactate kinetics after endurance training in men. **J Appl Physiol.** v. 87, n. 5, p. 1684-1696, 1999.

BILLAT, V. L.; SIRVENT, P.; PY, G.; KAROLSZTEIN, J.; MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: A bridge between biochemistry, physiology and sport science. **Sports Med.**, v. 33, n.6, p. 407-426, 2003.

BISHOP, D.; EDGE, J.; THOMAS, C.; MERCIER, J. High-intensity exercise decreases membrane MCT1 and MCT4 and muscle buffer capacity in human skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v. 2, p. 2-21, 2006.

BONEN, A. Lactate transporters (MCT proteins) in heart and skeletal muscles. **Med. Sci. Sports Exercise.** V. 32, n. 4, p. 779-789, 2000.

BONEN, A.; BAKER, S.K.; HATTA, H. Lactate transport and lactate transporters in skeletal muscle. **Can J Appl Physiol.** v. 22, n. 6, p. 531-552, 1997.

BONEN, A.; HEYNEN, M.; HATTA, H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and humans skeletal muscle. **Appl. Physiol. Nut. Metab.** v. 31, P. 31-39, 2006.

BONEN, A.; MISKOVIC, D.; TONOUCHE, M.; LEMIEUX, K.; WILSON, M.C.; MARETTE, A.; HALESTRAP, A.P. Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fast-twitch skeletal muscles. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 278, p.E1067-E1077, 2000_a.

BONEN, A.; TONOUCHE, M.; MISKOVIC, D.; HEDDLE, C.; HEIKKILA, J.J.; HALESTRAP, A.P. Isoform-specific regulation of the lactate transporters MCT1 and MCT4 by contractile activity. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 209, p. E1131-E1138, 2000_b.

BROER, S.; SCHNEIDER, H.P.; BROER, A.; RAHMAN, B.; HAMPRECHT, B.; DEITMER, J.W. Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. **Biochem J.** v. 333, n. 1, p. 167-174, 1998.

BROOKS, G.A. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 17, n. 1, p. 22-34, 1985.

BROOKS, G.A. Are arterial, muscle and working limb lactate exchange data obtained on men at altitude consistent with the hypothesis of an intracellular lactate shuttle? **Adv Exp Med Biol.** v. 474, p. 185-204, 1999.

BROOKS, G.A. Intra- and extra-celular lactate shuttles. **Med. Sci. Sports Exerc.** v. 32, n. 4, p. 790-799, 2000.

BROOKS, G.A. Lactate production under fully aerobic conditions: the lactate shuttle during rest and exercise. **Fed. Proc.** v. 45, n. 13, p. 2924-2929, 1986_a.

BROOKS, G.A. Lactate shuttles in nature. **Biochemical Society Transactions.** v. 30, n. 2, p. 258-264, 2002.

BROOKS, G.A. Lactate: Link between glycolytic and oxidative metabolism. **Sports Med.** v. 37, n. 4-5, p. 341-343, 2007.

BROOKS, G.A. Mammalian fuel utilization during sustained exercise. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** v. 120, n. 1, p. 89-107, 1998.

BROOKS, G.A. The lactate shuttle during exercise and recovery. **Med. Sci. Sports. Exerc.** v. 18, n. 3, p. 360-368, 1986_b.

BROOKS, G.A.; BROWN, M.A.; BUTZ, C.E.; SICURELLO, J.P.; DUBOCHAUD, H. Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. **J Appl Physiol.** v. 87, n. 5, p. 1713-1718, 1999_a.

BROOKS, G.A.; DUBOUCHAUD, H.; BROWN, M.; SICURELLO, J.P.; BUTZ, C.E. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 96, n. 3, p. 1129-1134, 1999_b.

BURGOMASTER, K.A.; CERMARK, N.M.; PHILLIPS, S.M.; BENTON, C.R.; BONEN, A.; GIBALA, M.J. Divergent response of metabolite transport proteins in human skeletal muscle after sprint interval training and detraining. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 292, p. R1970-R1976, 2007.

BURTZ, C.E.; McCLELLAND, G.B.; BROOKS, G.A. MCT1 conformed in rat striated muscle mitochondria. **J Appl Physiol**. v. 97, p. 1059-1066, 2004.

CARPENTER, L.; POOLE, R.C.; HALESTRAP, A.P. Cloning and sequencing of the monocarboxylate transporter from mouse Ehrlich Lettré tumour cell confirms its identity as MCT1 and demonstrates that glycosylation is not required for MCT1 function. **Biochim Biophys Acta**. v. 1279, n. 2, p. 157-163, 1996.

CATHCART, A.J.; TURNER, A.P.; BUTERWORTH, C.; PARKER, M.; WILSON, J.; WARD, S.A. Ventilatory control during intermittent high-intensity exercise in humans. **Adv Exp Med Biol**. v. 605, p. 203-208, 2008.

CHATHAM, J. C.; ROSIERS, C. D.; FORDER, J. R. Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 281, p. E794-E802, 2001.

COGGAN, A. R.; KOHRT, W.M.; SPINA, R.J.; KIRWAN, J.P.; BIER, D.M.; HOLLOSZY, J.O. Plasma glucose kinetics during exercise in subjects with high and low lactate thresholds. **J Appl Physiol**. v. 73, n. 5, p 1873-1880, 1992.

COLES, L.; LITT, J.; HATTA, H.; BONEN, A. Exercise rapidly increases expression of the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4. **J. Physiol**. v. 561, n.1, p. 253-261, 2004.

CONNETT, R.J.; GAYESK, T.E.; HONIG, C.R. Lactate efflux is unrelated to intracellular PO₂ in a working red muscle in situ. **J Apply Physiol.** v. 61, n.2, p.402-408, 1986.

CONSTANT, J.S.; FENG, J.J.; ZABEL, D.D.; YUAN, H.; SUH, D.Y.; SCHEUENSTUHL, H.; HUNT, T.K.; HUSSAIN, M.Z. Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. **Wound Repair Regen.** v. 8, n. 5, p. 353-360, 2000.

CORI, C.F. The glucose-lactic acid cycle and gluconeogenesis. **Curr Top Cell Regul.** v. 18, p. 377-387, 1981.

CORI, G.T.; CORI, C.F. Changes in hexosephosphate, glycogen, and lactic acid during contraction and recovery of mammalian muscle. **Journal of Biological Chemistry.** v. 99, n. 2, p.493-505, 1933.

DALSGAARD, M.K. Fuelling cerebral activity in exercising man. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.** v. 26, p. 731-750, 2006.

DE ARAÚJO G.G.; PAPOTI, M.; MANCHADO, F.B.; DE MELO, M.A.; MANCHADO-GOBATTO, C.A. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** 148(4):888-92, 2007.

DE BRUIJNE, A.W.; VREEBURG, H.; VAN STEVENINCK, J. Alternative-substrate inhibition of L-lactate transport via the monocarboxylate-specific carrier system in human erythrocytes. **Biochim Biophys Acta.** v. 812, n. 3, p. 841-844, 1985.

DE BRUIJNE, A.W.; VREEBURG, H.; VAN STEVENINCK, J. Kinetic analysis of L-lactate transport in human erythrocytes via the monocarboxylate-specific carrier system. **Biochim Biophys Acta.** v. 732, n. 3, p. 562-568, 1983.

DEBRAND, E.; HEARD, E.; AVNER, P.; Cloning and localization of the murine Xpct gene: evidence for complex rearrangements during the evolution of the region around the Xist gene. **Genomics**. v. 48, n. 3, p. 296-303, 1998.

DIENEL, G.A. Lactate muscles its way into consciousness: fueling brain activation. **Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 287, p. R519-R521, 2004.

DIMMER, K.; FRIEDRICH, B.; LANG, F.; DEITMER, J.W.; BROER, S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. **Biochem. J**. v. 350, p. 219-227, 2000.

DONAVAN, C.M.; BROOKS, G.A. Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. **Am. J. Physiol**. v. 244, n. 1, p. E83-E92, 1983.

DONAVAN, C.M.; PAGLIASSOTTI, M.J.; Endurance training enhances lactate clearance during hyperlactatemia. **Am J Physiol**. v. 257, p. E782-789, 1989.

DUBOUCHAUD, H.; BUTTERFIELD, G.E.; WOLFEL, E.E.; BERGMAN, B.C.; BROOKS, G.A.; Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. v. 278, p. E571-E579, 2000.

EYDOUX, N.; PY, G.; LAMBERT, K.; DUBOUCHAUD, H.; PREFAUT, C.; MERCIER, J. Training does not protect against exhaustive exercise-induced lactate transport capacity alterations. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 278, n. 6, p. E1045-E1052, 2000.

EVERTSEN, F.; MEDBO, J.I.; BONEM, A. Effect of training intensity on muscle lactate transporters and lactate threshold of cross-country skiers. **Acta. Physiol. Scand**. v. 173, p. 195-295, 2001.

FERGUNSON, C.; WHIPP, B.J.; CATHCART, A.J.; ROSSITER, H.B.; WARD, S.A. Effects of prior very-heavy intensity exercise on indices of aerobic function and high-intensity exercise tolerance. **J. Appl. Physiol.** v. 103, p. 812-822, 2007.

FERREIRA, J.C.B; ROLIM, N.P.L.; BATHOLOMEU, J.B.; GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E.; BRUM, P.C. Maximal lactate steady state in running mice: effects of exercise training. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology.** Doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04635.x, 2007.

FLETCHER, W.M.; HOPKINS, F.G.; Lactic acid in amphibian muscle. **J Physiol.** v. 35, n. 4; p. 247-309, 1907.

GARCIA, C.K.; BROWN, M.S.; PATHAK, R.N.; GOLDSTEIN, J.L. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. **J Biol Chem.** v. 270, n. 4, p. 1843-1849, 1995.

GARCIA, C.K.; GOLDSTEIN, J.L.; PATHAK, R.K.; ANDERSON, R.G.W.; BROWN, M.S. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, piruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori Cicle. **Cell.**, v. 76, p. 865-873, 1994_a.

GARCIA, C.K.; LI, X.; LUNA, J.; FRANCKE, U. Cdna cloning of the human monocarboxylate transporter 1 and chromosomal localization of the SLC16A1 locus to 1p13.2-p12. **Genomics.** v. 23, p. 500-503, 1994_b.

GARCIN, M.; MILLE-HAMARD, L.; BILLAT, V. Influence of aerobic fitness level on measured and estimated perceived exertion during exhausting runs. **Int J Sports Med.** v. 25, n. 4, 270-277, 2004.

GERHART, D.Z.; ENERSON, B.E.; ZHDANKINA, O.Y.; LEINO, R.L.; DREWES, L.R. Expression of the monocarboxylate transporter MCT2 by rat brain glia. **Glia** v. 22, n. 3, p. 272-281, 1998.

GERTZ, E.W.; WISNESKI, J. A.; STANLEY, W. C.; NEESE, A. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. **The journal of clinical investigation**. V. 82, p. 20017-2015, 1988.

GLADDEN, L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **J. Physiol**. v. 558, n.1, p. 5-30, 2004.

GLADDEN, L.B. Muscle as a consumer of lactate. **Med. Sci. Sports Exer**. v. 32, n. 4, p. 764-771, 2000.

GLADDEN, L.B. The role of skeletal muscle in lactate exchange during exercise: introduction. **Med. Sci. Sports Exer**. Skeletal Muscle symposium introduction, p. 753-755, 1998.

GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R.; SIBUYA, C. Y.; AZEVEDO, J. R. M.; SANTOS, L. A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol**, v.130A, p. 21-7, 2001.

GREEN, H.; GOLDBERG, B.; Collagen and cell protein synthesis by an established mammalian fibroblast line. **Nature**. v. 24, p. 347-349, 1964.

GREEN, H.; HALESTRAP, A.; MOCKETT, C.; O'TOOLE, D.; GRANT, S.; OUYANG, J. Increases in muscle MCT are associated with reductions in muscle lactate after single exercise session in humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**. v. 282, p. E154-E160, 2002.

HALESTRAP, A.P.; MEREDITH, D. The SLC16 gene famil – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. **Eur. J. Physiol**. v. 447, p. 619-628, 2004.

HALESTRAP, A.P.; PRICE, N.T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. **Biochem J.** v. 343, p. 281-299, 1999.

HALESTRAP, A.P.; WANG, X.; POOLE, R.C.; JACKSON, V.N.; PRICE, N.T. Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. **Am J Cardiol.** v. 80, n. 3A, p. 17A-25A, 1997.

HAMANN, J.J.; KELLEY, K. M.; GLADDEN, B. Effect of epinifrine on net lactate uptake by contracting skeletal muscle. **J. Appl. Physiol.** v. 91, p. 2635-2641, 2001.

HARGREAVES, M.; THOMPSON, M. Biochemistry of exercise. **The 10th international biochemistry of exercise conference**, Sidney, Australia, 1999.

HASHIMOTO, T.; HUSSIEN, R.; BROOKS, A. Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscles cells: evidence of mitochondrial lactate oxidation complex. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 290, p. E1237-E1244, 2006.

HASHIMOTO, T.; MASUDA, S.; TAGUCHI, S.; BROOKS, G.A. Immunohistochemical analysis of MCT1, MCT2 and MCT4 expression in rat plantaris muscle. **J. Physiol.** v. 567, n. 1, p. 121-129, 2005.

HASHIMOTO, T.; KAMBARA, N.; NOHARA, R.; YAZAWA, M.; TAGUCHI, S. Expression of MHC-beta and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. v. 97, n. 3, p. 843-851, 2004.

HATTA, H.; TONOUCHE, M.; MISCOVIC, D.; WANG, Y.; HEIKKILA, J.J.; BONEN, A. Tissue-specific and isoform-specific changes in MCT1 and MCT4 in heart and soleus muscle during a 1-yr period. **Am. J. Physiol Endocrinol Metab.** v. 281, p. E749-E756, 2001.

HECK, H.; MADER, A.; HESS, G.; MÜCKE, S.; MÜLLER, R.; HOLLMANN, W. Justification of the 4-mmol/L lactate threshold. *International Journal of Sports Medicine*, v.6, p.117-30, 1985.

IDE, K. SCHMALBRUCH, I.K.; QUISTORFF, B.; HORN, A.; SECHER, N.H. Lactate, glucose and O₂ uptake in human brain during recovery from maximal exercise. *J Physiol*. v. 522, n. 1, p. 159-164, 2000.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. **Optimization of PCRs, in PCR protocols: a guide to methods and applications** (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J., eds.), 1st edn., pp. 3-12, Academic Press, San Diego, CA, 1990.

IWANAGA, T.; TAKEBE, K.; KATO, I.; KARAKI, S.; KUWAHARA, A. Cellular expression of monocarboxylate transporter (MCT) in the digestive tract of the mouse, rat, and humans, with special reference to slc5a8. *Biomedical Research*. v. 25, n. 5, p. 243-254, 2006.

JACKSON, V.N.; PRICE, N.T.; CARPENTER, L.; HALESTRAP, A.P.; Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem J*. v. 324, n. 1, p. 447-453, 1997.

JACKSON, V.N.; PRICE, N.T.; HALESTRAP, A.P.; cDNA cloning of MCT1, a monocarboxylate transporter from rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta*. v. 1238, n. 2, p. 193-196, 1995.

JACKSON, V.N.; PRICE, N.T.; CARPENTER, L.; HALESTRAP, A.P. Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem. J*. v. 324, p. 447-453, 1994.

JUEL, C. Current aspects of lactate exchange: lactate/H⁺ transport in human skeletal muscle. **Eur. J. Appl Physiol.** v. 86, p. 12-16, 2001.

JUEL, C. Lactate-proton cotransport in skeletal muscle. **Physiol Rev.** v. 77, n. 2, p. 321-358, 1997.

JUEL, C. Training-induced changes in membrane transport proteins of human skeletal muscle. **Eur. J. Appl Physiol.** v. 96, p. 627-635, 2006.

JUEL, C.; HALESTRAP, A.P. Lactate transport in skeletal muscle – role and regulation of the monocarboxylate transporter. **J. Physiol.** v. 517, p. 633-642, 1999.

JUEL, C.; KLARSKOV, C.; NIELSEN, J.J.; KRUSTRUP, P. MUHR, M.; BANGSBO, J. Effect of high-intensity intermittent training on lactate and H⁺ release from human skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.** v. 286, p. E245-E251, 2004.

JUEL, C.; PILEGAARD, H. Lactate/H⁺ transport kinetics in rat skeletal muscle related to fibre type and changes in transport capacity. **Pflugers Arch.** v. 436, n. 4, p. 560-564, 1998.

KELLEY, K.M.; HAMANN, J.J.; NAVARRE, C.; GLADEN, L.B. Lactate metabolism in resting and contracting canine skeletal muscle with elevated lactate concentration. **J Appl Physiol.** v. 93, n. 3, p. 865-872, 2002.

KEMPER, W.F.; LINDSTEDT, S.L.; HARTZIER, L.K.; HICKS, J.W.; CONLEY, K.E. Shaking up glycolysis: sustained, high lactate flux during aerobic rattling. **PNAS.** v. 98, n. 2, p. 723-728, 2001.

KIM, C.M.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. Cdna cloning of MEV, a mutant protein that facilitates cellular uptake of mavalonate, and identification of the point mutation responsible for its gain of function. **The journal of biological chemistry.** v. 267, n. 32, p. 23113-23121, 1992.

KOCHLER-STEAC, E.M.; SIMPSON, I.A. VANUCCI, S.J.; LANDSCHULZ, K.T.; LANDSCHULZ, W.H. Monocarboxylate transporter expression in mouse brain. **Am. J. Physiol.** v. 275, p. E516-E524, 1998.

KRISTENSEN, M.; ALBERTSEN, J.; RENTSCH, M.; JUEL, C. Lactate and force production in skeletal muscle. **J. Physiol.** v. 562, n. 2, p. 521-526, 2005.

KWOK, S. AND HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR, **Nature** 339, 237-238, 1989

LAFRENIERE, R.G.; CARREL, L.; WILLARD, H.F. A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. **Hum Mol Genet.** v. 3, n. 7, p. 1133-1139, 1994.

LIN, R.Y.; VERA, J.C.; CHAGANTINI, R.S.; GOLDE, D.W. Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. **J Biol Chem.** v. 273, n. 44, p. 28959-28965, 1998.

MAHONEY, D.J.; CAREY, K.; FU, M.H.; SNOW, R.; CAMERON-SMITH, D.; PARISE, G.; TARNOPOLSKY, M.A. Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. **Physiol Genomics.** v. 18, n. 2, p. 226-231, 2004.

MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady state in running rats. **Journal of Exercise Physiology online**, v.8, p.29-35, 2005.

MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L., PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Máxima fase estável é ergômetro dependente em modelo experimental utilizando ratos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, n. 5, p. 259-262, 2006.

MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; VOLTARELLI, F.A.; MELLO, M.A.R. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v.31, p.731-736, 2006.

MANCHADO-GOBATTO, F.B.M. Protocolos invasivos e não invasivos para avaliação aeróbia e anaeróbia de ratos wistar. p. 234. **Tese de Doutorado em Ciências da Motricidade**. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Rio Claro, 2007.

MARCORA, S.; Is peripheral locomotor muscle fatigue during endurance exercise a variable carefully regulated by a negative feedback system? **J Physiol**. v. 586, n. 7; p. 2027-2028, 2008.

McARDLE, W.; KATCH V.; KATCH, F. **Fisiologia do Exercício – Energia, Nutrição e Desempenho**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

McCULLAGH, K.J.; BONEN, A. Reduced lactate transport in denervated rat skeletal muscle. **Am J Physiol**. v. 268, p. R884-R888, 1995.

McCULLAGH, K.J.; JUEL, C.; O'BRIEN, M.; BONEN, A. Chronic muscle stimulation increases lactate transport in rat skeletal muscle. **Mol Cell Biochem**. v. 156, n. 1, p. 51-57, 1996.

McDERMOTT, J.C.; BONEN, A. Endurance training increases skeletal muscle lactate transport. **Acta Physiol Scand**. v. 147, n. 3, p. 323-327, 1993_a.

McDERMOTT, J.C.; BONEN, A. Lactate transport by skeletal muscle sarcolemmal vesicles. **Mol Cell Biochem**. v. 26, n. 2, p. 113-121, 1993_b.

MESSONNIER, L.; KRISTENSEN, M.; JUEL, C.; DENIS, C. Importance of pH regulation and lactate/H⁺ transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. **J Appl Physiol**. v. 102, n. 5, p. 1936-1944, 2007.

MILLER, B.F.; FATTOR, J.A.; JACOBS, K.A.; HORNING, M.A.; NAVAZIO, F.; LINDINGER, M.I.; BROOKS, G.A. Lactate and glucose interactions during rest and exercise in men: effect of exogenous lactate infusion. **J Physiol.** v. 544, n. 3, p. 963-975, 2002.

MONEDERO, J.; DONNE, B. Effect of recovery interventions on lactate removal and subsequent performance. **Int. J. Sports Med.** v. 21, p. 593-597, 2000.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harpers: Ilustred bioquimetry.** 26^a ed, São Paulo: Atheneu, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger: **Principles of biochemistry.** 3^a ed, Worth Publishers, 2000.

PHILP, A.; MACDONALD, A.L.; WATT, P.W. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function. **The journal of experimental biology.** V. 208, p. 4561-4575, 2005.

PHILP, N.J.; OCHRIETOR, J.D.; RUDOY, C.; MURAMASU, T.; LINSER, P.J. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** v. 44, n. 3, p. 1305-1311, 2003.

PHILP, N.J.; YOON, H.; LOMBARDI, L. Mouse MCT3 gene is expressed preferentially in retinal pigment and choroid plexus epithelia. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 280, n. 5, p. C1319-1326, 2001.

PILEGAARD, H.; BANGSBO, J.; RICHTER, E.A.; JUEL, C. Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from human muscle biopsies: relation to training status. **J Appl Physiol.** v. 77, n. 4, p. 1858-1862, 1994.

PILEGAARD, H.; DOMINO, K.; NOLAND, T.; JUEL, C.; HELLSTEN, A.P.; BANGSBO, J. Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. **Am J Physiol.** v. 276, p. E255-E261, 1999_a.

PILEGAARD, H.; JUEL, C.; WIBRAND, F.; Lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles from rats: effect of training. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 264, p. E156-E160, 1993.

PILLEGARD, H.; TERZIS, G.; HALESTRAP, A.; JUEL, C. Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoformas MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. **Am. J. Physiol.** v. 276, p. E843-E848, 1999_b.

PILIS, W.; ZARZECZNY, R.; LANGFORT, J.; KACIUBA-USCILKO, H.; NAZAR, K.; WOJTYNA, J. Anaerobic threshold in rats. *Comparative Biochemistry Physiology*. **A Molecular & Integrative Physiology**, v.106A, p.285-9. 1993.

POOLE R.C.; HALESTRAP, A.P. Interaction of the erythrocyte lactate transporter (monocarboxylate transporter 1) with an integral 70-kDa membrane glycoprotein of the immunoglobulin superfamily. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 23, p. 14624-14628, 1997.

POOLE R.C.; HALESTRAP, A.P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. **Am. J. Physiol.** v. 264, n. 4, p. C761-C782, 1993.

POOLE, R.C. & HALESTRAP A.P. Identification and partial purification of the erythrocyte I-lactate transporter. **Biochem. J.** v. 283, p. 855-862, 1992.

POOLE, R.C.; HALESTRAP, A.P. N-terminal protein sequence analysis of the rabbit erythrocyte lactate transporter suggests identity with the cloned monocarboxylate transport protein MCT1. **Biochem J.** v. 303, p. 155-159, 1994.

POWERS, S.K.; HOWLEY, T.H. **Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho.** 1^a ed. Barueri: Ed. Manole, 2000.

PRICE, N.T.; JACKSON, V.N.; HALESTRAP, A.P. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. **Biochem J.** v. 329, n. 15, p. 321-328, 1998.

PRICE, N.T.; JACKSON, V.N.; HALESTRAP, P. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. **Biochem J.** v. 329, p. 321-325, 1995.

RAFALSKI, K.; ABDOURAHMAN, A.; EDWARDS, J.G. Early adaptations to training: upregulation of alpha-myosin heavy chain gene expression. **Med Sci Sports Exerc.** 39(1):75-82, 2007.

RECHSTEINER, M.; ROGERS, S.W. PEST sequences and regulation by proteolysis. **Trends Biochem Sci.** v. 21, n. 7, p. 267-271, 1996.

RICHARDSON, R.S.; NOYSZEWSKI, E.A.; LEIGH, J.S.; WAGNER, P.D. Lactate efflux from exercising human skeletal muscle: role of intracellular PO₂. **J Appl Physiol.** v. 85, n. 2, p. 627-634, 1998.

RITZHAUPT, A.; WOOD, I.S.; ELLIS, A.; HOSIE, K.B.; SHIRAZI-BEECHEY, S.P. Identification and characterization of monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport L-lactate as well as butyrate. **J. Physiol.** v. 513, p. 719-732, 1998.

ROBERGS, A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D.; Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 287, p. R502-R516, 2004.

ROEF, M.J.; DE MEER, K.; KALHAM, S.C.; STRAVER, H.; BERGER, R.; REIJNGOUD, D.J. Gluconeogenesis in humans with induced hyperlactatemia during low-intensity exercise. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 284, n. 6, p. E1162-E1171, 2003.

SAMBROOK, J.; GETHING, M.J.; Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**. v. 342, p. 224-225, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W.; **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3th edn., A8.21, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SECHER, N. H.; SEIFERT, T.; LIESHOUT, J. J. V. Cerebral blood flow and metabolism during exercise: implications for fatigue. **J. Appl Physiol**. v. 104, n. 1, p. 306-314, 2008.

SEPPONEN, K.; KOHO, N.; PUOLANNE, E.; RUUSUNEN, M.; POSO, A.R.; Distribution of monocarboxylate transporter isoforms MCT1, MCT2 and MCT4 in porcine muscles. **Acta Physiol Scand**. v. 177, n. 1, p. 79-86, 2003.

SIMPSON, I.A.; CARRITHERS, A.; VANNUCCI, S.J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. **J Cereb Blood Flow Metab**. v. 27, n. 11, p. 1766-1791, 2007.

SPRIET, L.L.; HOWLET, R.A.; HEIGENHAUSER, G.J.F. An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. **Med. Sci. Sports Exerc**. v. 32, n. 4, p. 756-763, 2000.

STANLEY, W.C. Myocardial lactate metabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc**. v. 23, n. 8, p. 920-924, 1991.

SUMIDA, K.D.; DONAVAN, C.M. Lactate removal is not enhanced in nonstimulated perfused skeletal muscle after endurance training. **J Appl Physiol**. v. 90, n. 4, p. 1307-1313, 2001.

SVEDAHL, K.; MACINTOSH, B.R.; Anaerobic threshold: the concept and methods of measurement. **Can J Appl Physiol**. v. 28, n. 2, p. 299-323, 2003.

THOMAS, C.; BISHOP, D.; MOORE-MORRIS, T.; MERCIER, J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4 and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. **Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.** v. 293, n. 4, p. E916-E922, 2007.

THOMAS, C.; PERREY, S.; LAMBERT, K.; HUGON G.; MORNET, D.; MERCIER, J. Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. **J. Appl. Physiol.** v. 98, p. 804-809, 2005.

TONOUCHI, M.; HATTA, H.; BONEN, A.; Muscle contraction increases lactate transport while reducing sarcolemmal MCT4, but not MCT1. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 282, p. E1062-E1069, 2002.

TRABOLD, O.; WAGNER, S.; WINCKE, C.; SCHEUENSTUHL, H.; HUSSAIN, M.Z.; ROSEN, N.; SEREMETIEV, A.; BECKER, H.D.; HUNT, T.K. Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. **Wound Repair Regen.** v. 11, n. 6, p. 504-509, 2003

TRAPP, E.G.; CHISHOLM, D.J.; BOUTCHER, S.H. Metabolic response of trained and untrained women during high-intensity intermittent cycle exercise. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 293, n. 6, p. R2370-2375, 2007.

VAN PRAAGH, E.; DORÉ, E.; Short-term muscle power during growth and maturation. **Sports Med.** v. 32, n. 11, p. 701-728, 2002.

VERLENGIA, R.; GORJÃO, R.; KANUNFRE, C.C.; BORDIN, S.; DE LIMA, T.M.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. Genes regulated by arachidonic and oleic acids in Raji cells. **Lipids.** v. 38, n. 11, p. 1157-1165, 2003_a.

VERLENGA, R.; GORJÃO, R.; KANUNFRE, C.C.; BORDIN, S.; DE LIMA, T.M.; CURI, R. Effect of arachidonic acid on proliferation, cytokines production and pleiotropic genes expression in Jurkat cells--a comparison with oleic acid. **Life Sci.** v. 73, n. 23, p. 2939-2951, 2003_b.

VOET, D.; VOET, J. **Bioquímica**. 3^a ed, Porto Alegre: Artmed, 2006.

WILSON, M.C.; JACKSON, V.N.; HEDDLE, C.; PRICE, N.T.; PILEGAARD, H.; JUEL, C.; BONEN, A.; MONTGOMERY, I.; HUTTER, O.F.; HALESTRAP, A.P. Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. **J Biol Chem**. v. 273, n. 26, p. 15920-15926, 1998.

YOON, H.; FANELLI, A.; GROLLMAN, E.F.; PHILP, N.J.; Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 234, n.1, p. 90-94, 1997.

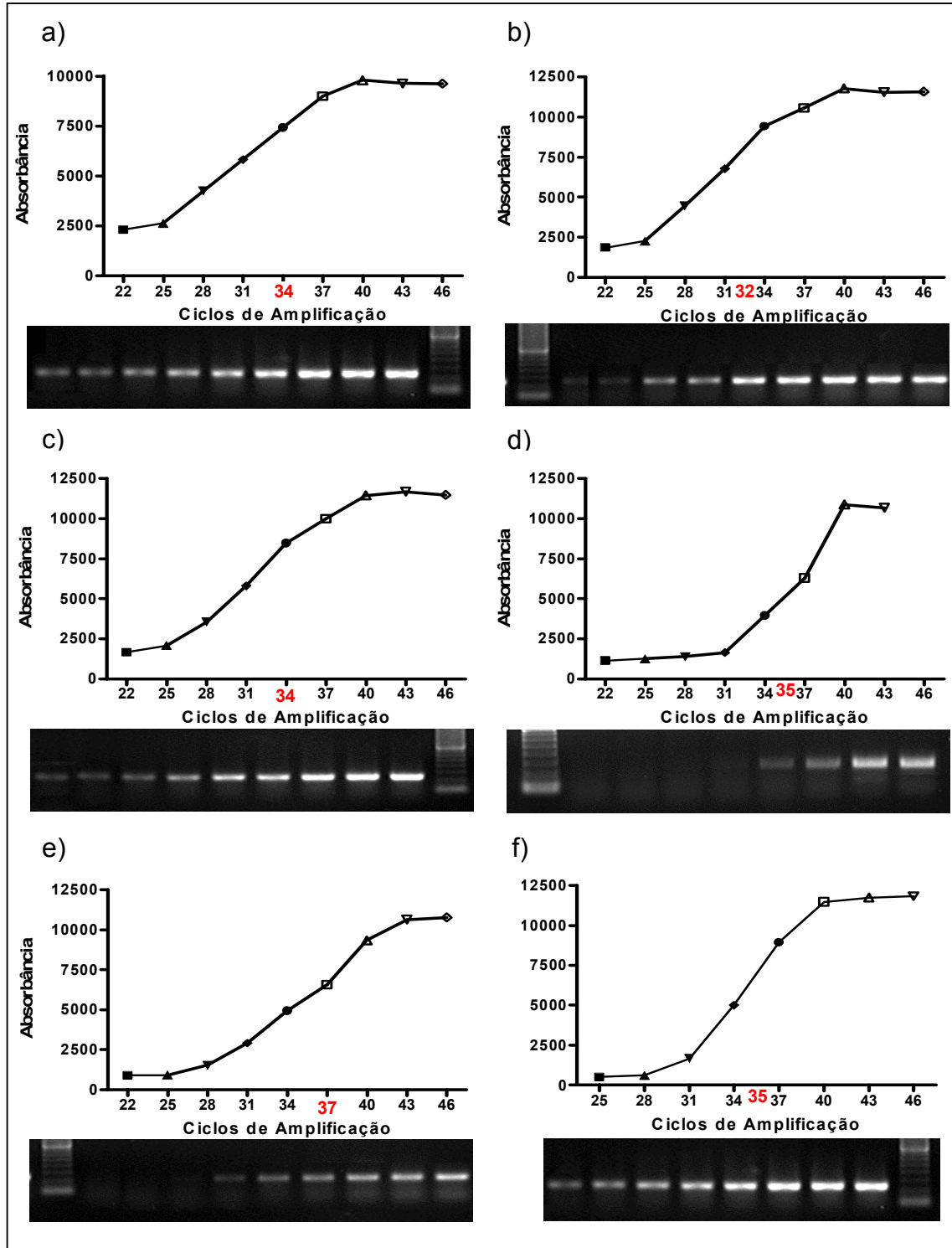
YOON, H.; PHILP, N.J.; Genomic structure and developmental expression of the chicken monocarboxylate transporter MCT3 gene. **Exp Eye Res**. v. 67, n. 4, p. 417-424, 1998.

YOSHIDA, Y.; HATTA, H.; KATO, M.; ENOKI, T.; KATO, H.; BONEN, A. Relationship between skeletal muscle MCT1 and accumulated exercise during voluntary wheel running. **J. Appl. Physiol**. v. 97, p. 527-534, 2004.

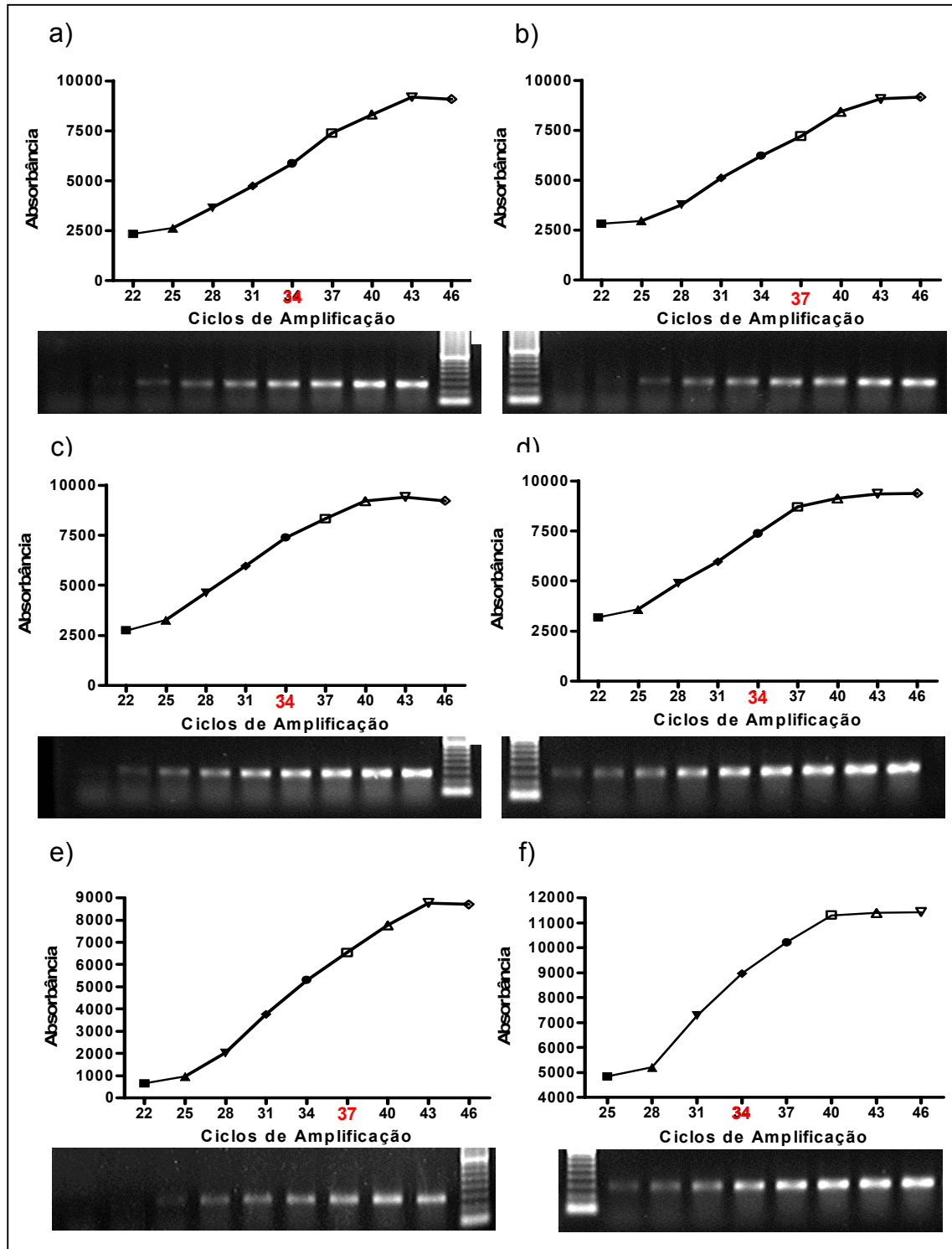
ZHOU, L.; CABRERA, M.E.; OKERE, I.C.; SHARMA, N.; STANLEY, W.C. Regulation of myocardial substrate metabolism during increased energy expenditure: insights from computational studies. **Am. J. Physiol. Heart. Care. Physiol**. v. 291, p. H1036-H1046, 2006.

9 - ANEXOS

Anexo 1. Análise densitométrica da RT-PCR e perfil eletroforético dos fragmentos do produto de PCR obtidos em diferentes pontos da amplificação para padronização do número de ciclos de amplificação para o gene MCT1 a partir do RNA total extraído de diferentes tecidos sob temperatura de anelamento de 57,1°C. Em vermelho, o ciclo de escolha para avaliação da expressão gênica. a) Coração, 34 ciclos; b) Fígado, 32 ciclos; c) Porção vermelha do gastrocnêmio, 34 ciclos; d) Porção branca do gastrocnêmio, 35 ciclos; e) Sóleo, 37 ciclos; e f) Bíceps, 35 ciclos.



Anexo 2. Análise densitométrica da RT-PCR e perfil eletroforético dos fragmentos do produto de PCR obtidos em diferentes pontos da amplificação para padronização do número de ciclos de amplificação para o gene MCT4 a partir do RNA total extraído de diferentes tecidos sob temperatura de anelamento de 58,2°C. Em vermelho, o ciclo de escolha para avaliação da expressão gênica. a) Coração, 34 ciclos; b) Fígado, 37 ciclos; c) Porção vermelha do gastrocnêmio, 34 ciclos; d) Porção branca do gastrocnêmio, 34 ciclos; e) Sóleo, 37 ciclos; e f) Bíceps, 34 ciclos.



Anexo 3. Análise densitométrica da RT-PCR e perfil eletroforético dos fragmentos do produto de PCR obtidos em diferentes pontos da amplificação para padronização do número de ciclos de amplificação para o gene β -actina a partir do RNA total extraído de diferentes tecidos sob temperatura de anelamento de 58,2°C. Em vermelho, o ciclo de escolha para avaliação da expressão gênica. a) Coração, 30 ciclos; b) Fígado, 34 ciclos; c) Porção vermelha do gastrocnêmio, 32 ciclos; d) Porção branca do gastrocnêmio, 32 ciclos; e) Sóleo, 34 ciclos; e f) Bíceps, 34 ciclos.

