

EFEITOS DO MODELO VIVER ALTO-TREINAR BAIXO SOBRE O CONTEÚDO PROTEICO DE HIF1- α EM TECIDO MUSCULAR E A VELOCIDADE CRÍTICA EM CAMUNDONGOS

Palavras-Chave: HIPÓXIA, VELOCIDADE CRÍTICA, HIF1- α

Autores(as):

MATHEUS RODRIGUES DOS SANTOS, FCA – UNICAMP

JUAN BORDON ORSI, FCA – UNICAMP

Prof. Dr. MARCELO PAPOTI - EEFERP - USP

Profa. Dra. FÚLVIA DE BARROS MANCHADO GOBATTO, FCA – UNICAMP

Prof. Dr. CLAUDIO ALEXANDRE GOBATTO (orientador), FCA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Desde os Jogos Olímpicos de 1968, diferentes modelos de treinamento relacionados à altitude foram estudados, como o "Viver alto–Treinar alto" (VA-TA), onde atletas vivem e treinam em altitude (hipóxia), promovendo alterações hematológicas, mas nem sempre resultando em ganhos na performance, como por exemplo aumento do VO_{2max} (Bailey & Davies, 1997). Para superar essas limitações, o modelo "Viver alto–Treinar baixo" (VA-TB), introduzido por Levine & Stray-Gundersen (1997), propõe a exposição contínua à hipóxia, associada ao treino em normóxia, na qual foi relatada melhoria significativa na massa de células vermelhas e potência aeróbia. Diante desses resultados, o modelo de treinamento VA-TB ganhou destaque na fisiologia do exercício, sendo estudado principalmente em atletas de elite (Stray-Gundersen, Chapman & Levine, 2001). Para o modelo animal, o VA-TB mostrou-se eficiente em aumentar a densidade mineral óssea em 8 semanas de exposição (Beck *et al.*, 2024) e a capacidade aeróbia em 4 semanas (Scariot *et al.*, 2023), sendo essa avaliada por meio do protocolo de velocidade crítica (VC). O modelo VA-TB busca, principalmente, melhorar a aptidão aeróbia com consequente aprimoramento do desempenho de atletas de *endurance*. Contudo, já foi evidenciado que a exposição à hipóxia afeta o metabolismo anaeróbio em vários níveis, uma vez que a falta de oxigênio (O_2) reduz a dependência da fosforilação oxidativa mitocondrial dependente de O_2 para a manutenção do exercício, induzindo o maior fluxo da via glicolítica para manter a produção suficiente de ATP de forma anaeróbia (Kierans & Taylor, 2021). Além disso, a hipóxia causa uma maior expressão da proteína HIF1- α (Pescador *et al.*, 2010), conhecida como um importante fator de transcrição que regula o metabolismo glicolítico (Abe *et al.*, 2015). Pescador *et al.* (2010) demonstraram que a superexpressão de HIF-1 α pela baixa disponibilidade de O_2 é responsável pela ativação da proteína Glycogen Synthase-1, que desempenha um papel fundamental no acúmulo de glicogênio muscular, tornando-se importante para o desempenho, pois maiores quantidades do polissacarídeo estão diretamente relacionados com a manutenção e aumento da intensidade do esforço, especialmente em provas de *endurance* (Hearris *et al.*, 2018). Portanto, é notória a importância da investigação de proteínas chave para o metabolismo glicolítico, como a HIF1- α , bem como parâmetros relacionados a desempenho. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi mensurar o conteúdo proteico de HIF-1 α em tecido muscular de camundongos C57BL/6J submetidos a sete semanas do modelo de treinamento VA-TB, bem como investigar sua correlação com a capacidade aeróbia, avaliada por meio do protocolo de velocidade crítica (VC) na última semana do experimento.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Animais e local

Foram utilizados 40 camundongos isogênicos C57BL/6J, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e inicialmente alojados no Biotério da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP), Campus de Limeira - SP. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvilab®, CR1, Nuvital) e receberam água *ad libitum*. O experimento foi realizado de acordo com a legislação Brasileira corrente e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal foram rigorosamente seguidas. A realização da pesquisa se iniciou somente após a aprovação da comissão de ética no uso de animais (CEUA – UNICAMP, sob o protocolo número 6525-1/2024). Os camundongos foram mantidos em gaiolas convencionais

de polietileno e dez animais de cada grupo foram confinados em uma única caixa. Nossa escolha para preservar a habitação social, em vez de fornecer uma gaiola para cada animal foi baseada no fato de que o isolamento social pode ser maléfico para camundongos (Riittinen *et al.*, 1986; Valzelli, 1973). As caixas dos animais pertencentes aos grupos que habitaram em ambiente de hipóxia (Hx) foram alocadas dentro das tendas normobáricas (Colorado Altitude Training's Controlled Tent Systems™), sendo a hipóxia gerada pelo equipamento *Hypoxic Everest Summit II Generator®*. Os animais dos grupos Hx foram diariamente expostos ao ambiente hipóxico (18h.dia⁻¹) a uma fração inspirada de oxigênio (FIO₂) equivalente a 14,5% (~3000m). Os experimentos foram conduzidos na cidade de Limeira-SP, a qual possui altimetria em torno de 588 metros e FIO₂ aproximadamente de 19,5%. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado (22°C), umidade relativa do ar entre 45 e 55%, ruídos não ultrapassando 85 decibéis e ciclo claro/escuro de 12/12horas, sendo a luz acesa às 6:00h e apagada às 18:00h.

Desenho experimental

Aos cinco meses de idade, animais adultos (150 dias) foram aleatoriamente divididos em 2 tipos de alojamento: Normóxia (Nx) e Hipóxia (Hx). Para cada alojamento, os camundongos foram randomicamente distribuídos em outros 2 grupos experimentais: Não-treinado (N) e Treinado (T). Dessa forma, os animais foram alojados da seguinte forma: Grupo Normóxia/Não-treinado (Nx/N, n=10), animais que não foram submetidos ao treinamento físico aeróbio e foram continuamente alojados em condições de normóxia. Grupo Normóxia/Treinado (Nx/T, n=10), que realizaram treinamento físico aeróbio em condições de normóxia e foram continuamente alojados em condições de normóxia. Grupo Hipóxia/Não-treinado (Hx/N, n=10), camundongos não submetidos ao treinamento físico aeróbio, mas alojados em ambiente hipóxico. Grupo Hipóxia/Treinado (Hx/T, n=10), animais que foram submetidos ao treinamento físico aeróbio e também alojados em condições de hipóxia. Os camundongos foram mantidos sob as intervenções experimentais durante 7 semanas, com eutanásia efetuada 48h após a última sessão de treinamento.

Protocolo de velocidade crítica e treinamento físico aeróbio

Durante o período experimental, os camundongos T foram submetidos a um programa de treinamento aeróbio contínuo, executado em esteira rolante em normóxia. O protocolo da VC foi útil para prescrever o treinamento físico dos camundongos T previamente ao início do experimento. A avaliação das capacidades aeróbia e anaeróbia foi realizada pelo protocolo de VC (Billat *et al.*, 2005), a partir da aplicação de 4 esforços aleatórios e individualizados de corrida em esteira rolante (intensidades 18 à 27 m/min) e registro do tempo limite de cada esforço em segundos. As intensidades de exercício foram individualmente selecionadas para que o tempo limite estivesse entre 1 a 15 min, de acordo com os pressupostos do protocolo (Manchado-Gobatto *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2023). A partir de uma relação linear entre distância vs. tempo limite foi possível determinar o coeficiente angular e o intercepto y, os quais correspondem, respectivamente à VC (capacidade aeróbia) e a capacidade de corrida anaeróbia (CCA, capacidade anaeróbia) (Billat *et al.*, 2005). Vale ressaltar que os animais passaram por um período de 3 dias para adaptação e familiarização com a esteira rolante. As sessões de treinamento foram compostas por volume diário de 40 min, e ocorreram em uma frequência de cinco dias por semana, durante sete semanas, sempre em condições de normóxia (independente do grupo estudado). A intensidade de corrida (m/min) foi de 80% da intensidade da VC, com os animais correndo em baias individualizadas. Considerando sua proximidade com a intensidade de máxima fase estável de lactato, como já observado em ratos e camundongos (Manchado-Gobatto *et al.*, 2010; Orsi *et al.*, 2023), a intensidade de treinamento (80% da velocidade crítica) foi escolhida visando adaptações aeróbias. Todos os procedimentos laboratoriais foram conduzidos sempre no mesmo horário do dia, tendo início às 6h e finalizado 12h.

Obtenção do material biológico e mensuração do conteúdo proteico (Western Blotting)

O método de eutanásia foi o deslocamento cervical. Após o procedimento, amostras do músculo esquelético sóleo foram coletadas e armazenadas a uma temperatura de -80°C. Os tecidos retirados foram lisados (por maceração) em RIPA buffer 1% de Triton, 20mM de Tris HCl, 150mM de NaCl, 5mM de EGTA, 10mM de EDTA e 10% de glicerol, contendo inibidores de protease e fosfatase diluídos (1:100). Os volumes utilizados foram 180µL. Após a homogeneização, foi utilizado sonicador em gelo (aproximadamente 60%) durante 6-7s e centrifugação por 10min a 12000rpm. Com coleta dos sobrenadantes armazenados a -80°C. A concentração proteica foi quantificada por método colorimétrico e ajustada para 40µg em volume de 9µL para correção no gel,

adicionando-se 3µL de LDS buffer (Lithium dodecyl sulfate com 1% mercaptoetanol). As amostras foram aquecidas a 95-98 °C por 10 minutos, resfriadas em gelo e centrifugadas brevemente antes de carregar 12 µL em gel Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus (15 poços). O gel foi corrido a 125 V em cuba com tampão Tris, reservando o primeiro poço para marcador de peso molecular Mark12™. Proteínas foram transferidas para membrana PVDF usando sistema Invitrogen iBlot® 2 em 6 minutos para posterior coloração Revert™ (total protein stain) detectada por fluorescência (Odyssey-Li-COR, canal 700). Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite 1% em PBS e incubada com anticorpo primário específico em solução de leite 5% PBST por 60 minutos. Após lavagem com PBST, anticorpo secundário fluorescente (Li-Cor) foi aplicado por 60 minutos em ambiente escuro. Novas lavagens foram feitas para remoção de anticorpos não ligados e a fluorescência final foi medida no scanner Odyssey-Li-COR (canal 800), com detecção da proteína HIF1-α na musculatura oxidativa (sóleo) dos camundongos.

Tratamento estatístico

Todos os dados estão apresentados em média e erro padrão ($\pm$ EP). A normalidade dos parâmetros mensurados foi verificada pelo teste de Shapiro- Wilk. A análise de variância (ANOVA fatorial) foi efetuada para analisar o efeito do treinamento físico aeróbio e exposição à hipóxia bem como suas interações sobre todas as variáveis previstas. A homogeneidade foi atestada pelo teste de Levene. Post Hoc de Fisher LSD foi utilizado. Para os testes de correlação entre as variáveis foi utilizado o teste de correlação produto-momento de Pearson. Em todos os casos o nível de significância foi fixado em 5% ($P < 0.05$).

RESULTADOS:

A figura 1 apresenta as comparações de conteúdo proteico (sinal normalizado pela proteína total em cada lane) da musculatura do sóleo dos animais dos grupos Nx-N ($0,21 \pm 0,04$), Nx-T ($0,28 \pm 0,03$), Hx-N ($0,30 \pm 0,07$) e Hx-T ($0,40 \pm 0,08$). Como pode ser observado na figura 1, nenhum grupo experimental apresentou diferença estatística significativa.

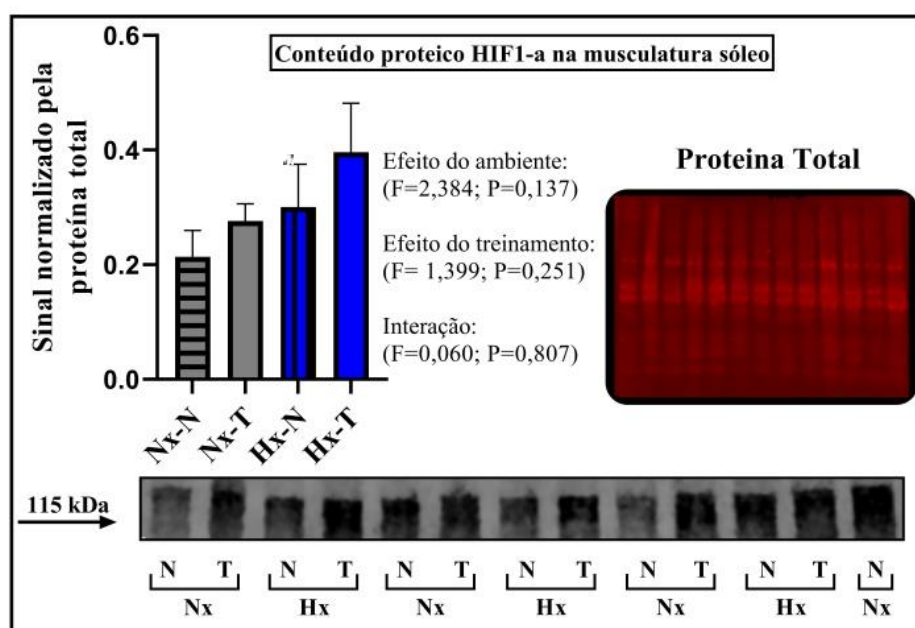


Figura 1. Comparação dos conteúdos da proteína na musculatura do sóleo dos camundongos expostos ao desenho experimental. A figura ilustra um Western blot representativo usando detecção de anticorpos HIF1-α e uma membrana após coloração com coloração total de Protein REVERT®. Todas as membranas foram coradas para que a proteína total normalizasse as diferenças interfaciais no carregamento de proteínas. A proteína possui um peso molecular de 115kDa.

A figura 2 apresenta a comparação dos valores de velocidade crítica (m/min) dos camundongos C57BL/6J dos quatro grupos experimentais. Os animais dos grupos Nx-T ($25,34 \pm 0,7$), Hx-N ($23,60 \pm 0,4$) e Hx-T ($23,47 \pm 1,1$) apresentaram valores significativamente maiores em relação ao do Nx-N ($21,26 \pm 0,5$), isso apresentou um efeito significativo do treinamento e interação.

A figura 3 demonstra as correlações de conteúdo proteico de HIF1- α com a velocidade crítica da última semana experimental dos camundongos. Apenas o grupo Hx-T apresentou uma correlação significativa ($p=0,001$).

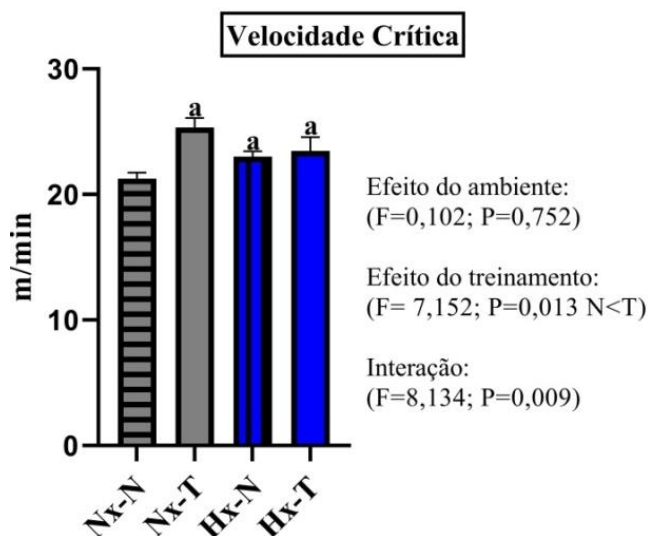


Figura 2. Comparação dos valores de velocidade crítica dos animais. Análise estatística: **a** representa diferença estatística significativa $<0,05$ em relação ao Nx-N.

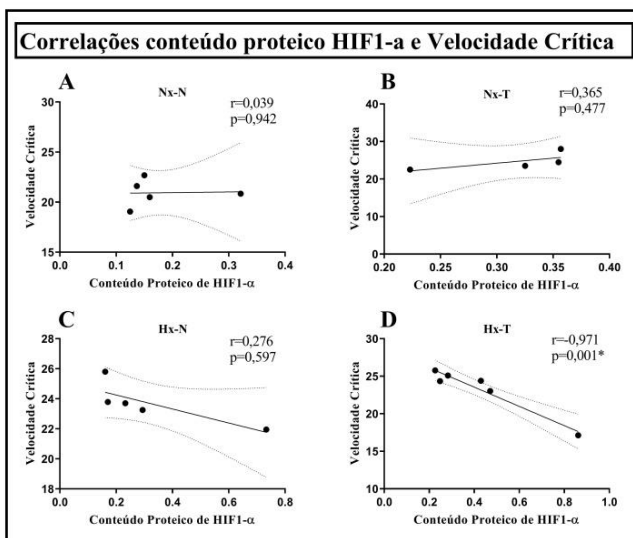


Figura 3. Correlações de conteúdo proteico de HIF1- α com a velocidade crítica da última semana experimental dos camundongos. Paineis A, B, C e D representam os grupos Nx-N, Nx-T, Hx-N e Hx-T, respectivamente. Foi utilizada a correlação de produto-momento de Pearson. *Correlação significativa ($p<0,05$).

DISCUSSÃO:

O presente estudo realizou o teste da VC para estimar a capacidade aeróbia (Billat *et al.*, 2005), sendo esse método bastante aplicável na avaliação e prescrição de treinamento para roedores, dada sua característica não invasiva. Na figura 2 é possível visualizar que o grupo Nx-N apresentou o menor valor de VC em relação aos demais. Ainda, um resultado de destaque foi a diferença estatística encontrada para esse parâmetro entre os grupos Nx-N e Hx-N, mostrando que a 7 semanas de exposição ao ambiente hipóxico foi capaz de aumentar a capacidade aeróbia dos camundongos. Entretanto, apesar da significativa interação (ambiente e treinamento), os camundongos do grupo Hx-T não apresentaram valores estatisticamente maiores de VC em comparação ao Nx-T. Algo que é muito discutido no campo da fisiologia do exercício, em especial na associação do exercício físico com a hipóxia, é a variação interindivíduos expostos à altitude (Thorwarth *et al.*, 2007). Assim, tornam-se necessárias mais investigações sobre a dose de hipóxia individual, capaz de influenciar, de forma significativa, parâmetros que estejam diretamente relacionados à capacidade aeróbia. Tais pesquisas auxiliarão, de forma suntuosa, em futuras investigações que visam utilizar intervenções com modelos relacionados à altitude.

Além disso, o trabalho buscou mensurar o conteúdo proteico de HIF1- α na musculatura oxidativa (sóleo) dos camundongos submetidos ao VA-TB. Após as análises biomoleculares e estatísticas, não identificamos diferença significativa para esse parâmetro, em nenhum grupo avaliado, o que contraria a nossa hipótese sobre o efeito do “viver alto” sobre a expressão de HIF1- α , conforme reportado por Pescador *et al.* (2010). Possivelmente, o não aumento do conteúdo proteico de HIF1- α dos animais Hx deve-se ao fato da permanência dos camundongos nessa condição ambiental por 18h diárias, sendo as 6 demais horas expostos ao ambiente de normóxico para treinamento e manutenção das caixas. Tal exposição ao ambiente normóxico, por mais que seja por um menor período, pode ter afetado os níveis de proteína de HIF1- α , visto que já foi relatado que muitas respostas celulares ao baixo O_2 são revertidas após a reoxigenação, incluindo a ativação da via HIF, devido à detecção de O_2 por meio de enzimas dependentes de O_2 (Batie *et al.*, 2022). A figura 3 exprime a correlação inversa entre o conteúdo proteico de HIF1- α com a velocidade crítica dos animais Hx-T, ou seja, quanto maior o conteúdo proteico da proteína, menor a intensidade de VC. Por nossa hipótese, o motivo desse achado se deve ao fato de que a

musculatura do sóleo é sensível ao oxigênio e ao treinamento (Çolak, Ağaçcıoğlu & Çakatay, 2021) e, além disso, existe um mecanismo de regulação da atividade da HIF-1 para o treinamento de endurance (Lindholm & Rundqvist, 2016), podendo ser ativado para os animais de maior VC. Além disso, considerando ser a HIF1- α um importante fator de transcrição que regula o metabolismo glicolítico (Abe *et al.*, 2015), contribuindo para o acúmulo de glicogênio (Pescador *et al.*, 2010), é notória a importância de mais estudos para investigar outros parâmetros do metabolismo da glicose, bem como sobre a via HIF para uma melhor compreensão de como a hipóxia pode contribuir para um melhor desempenho de um atleta.

CONCLUSÕES:

Diante dos resultados do presente estudo, nota-se que apesar da proteína HIF1- α ser ativada em condições de redução de oxigênio por hipóxia ambiental, aparenta ser sensível a reoxigenação, com consequente retomada aos níveis basais de conteúdo proteico. Além disso, a dose de hipóxia pode ser um fator determinante para impactar nos parâmetros de desempenho como VC, evidenciando a importância de ser levada em conta para estudos futuros.

Agradecimentos: ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à FAPESP (proc.2023/02728-3).

REFERÊNCIAS:

- ABE, T.; KITAOKA, Y.; KIKUCHI, D. M.; TAKEDA, K. *et al.* High-intensity interval training-induced metabolic adaptation coupled with an increase in Hif-1 α and glycolytic protein expression. **Journal of applied physiology**, 119, n. 11, p. 1297-1302, 2015.
- BAILEY, D. M.; DAVIES, B. Physiological implications of altitude training for endurance performance at sea level: a review. **British journal of sports medicine**, 31, n. 3, p. 183-190, 1997.
- BATIE, M.; FROST, J.; SHAKIR, D.; ROCHA, S. Regulation of chromatin accessibility by hypoxia and HIF. **Biochemical Journal**, 479, n. 6, p. 767-786, 2022.
- BECK, W. R.; SCARIOT, P. P. M.; PAPOTI, M.; PEJON, T. M. M. *et al.* Living High-Training Low on Mice Bone Parameters Analyzed through Complex Network Approach. **International Journal of Sports Medicine**, 2024.
- BILLAT, V. L.; MOUISEL, E.; ROBLLOT, N.; MELKI, J. Inter- and intrasession variation in mouse critical running speed. **Journal of applied physiology**, 98, n. 4, p. 1258-1263, 2005.
- ÇOLAK, R.; AĞAŞCIÖĞLU, E.; ÇAKATAY, U. "Live high train low" hypoxic training enhances exercise performance with efficient redox homeostasis in rats' soleus muscle. **High altitude medicine biology**, 22, n. 1, p. 77-86, 2021.
- HEARRIS, M. A.; HAMMOND, K. M.; FELL, J. M.; MORTON, J. P. Regulation of muscle glycogen metabolism during exercise: implications for endurance performance and training adaptations. **Nutrients**, 10, n. 3, p. 298, 2018.
- KIERANS, S.; TAYLOR, C. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. **The Journal of physiology**, 599, n. 1, p. 23-37, 2021.
- LEVINE, B. D.; STRAY-GUNDERSEN, J. "Living high-training low": effect of moderate-altitude acclimatization with low-altitude training on performance. **Journal of applied physiology**, 83, n. 1, p. 102-112, 1997.
- LINDHOLM, M. E.; RUNDQVIST, H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. **Experimental physiology**, 101, n. 1, p. 28-32, 2016.
- MANCHADO-GOBATTO, F.; GOBATTO, C. A.; CONTARTEZE, R. V. L.; PAPOTI, M. *et al.* Determination of Critical Velocity and Anaerobic Capacity of Running Rats. **Journal of Exercise Physiology Online**, 13, n. 4, 2010.
- ORSI, J. B.; ARAUJO, L. S.; SCARIOT, P. P.; POLISEL, E. E. *et al.* Critical Velocity, Maximal Lactate Steady State, and Muscle MCT1 and MCT4 after Exhaustive Running in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, 24, n. 21, p. 15753, 2023.
- PESCADOR, N.; VILLAR, D.; CIFUENTES, D.; GARCIA-ROCHA, M. *et al.* Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. **PLoS one**, 5, n. 3, p. e9644, 2010.
- RIITTINEN, M. L.; LINDROOS, F.; KIMANEN, A.; PIENINKEROINEN, E. *et al.* Impoverished rearing conditions increase stress-induced irritability in mice. **Dev Psychobiol**, 19, n. 2, p. 105-111, Mar 1986.
- SCARIOT, P. P. M.; PAPOTI, M.; POLISEL, E. E. C.; ORSI, J. B. *et al.* Living high-training low model applied to C57BL/6J mice: Effects on physiological parameters related to aerobic fitness and acid-base balance. 317, p. 121443, 2023.
- STRAY-GUNDERSEN, J.; CHAPMAN, R. F.; LEVINE, B. D. "Living high-training low" altitude training improves sea level performance in male and female elite runners. **Journal of applied physiology**, 91, n. 3, p. 1113-1120, 2001.
- THORWARTH, D.; ESCHMANN, S.-M.; PAULSEN, F.; ALBER, M. Hypoxia dose painting by numbers: a planning study. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, 68, n. 1, p. 291-300, 2007.
- VALZELLI, L. The "isolation syndrome" in mice. **Psychopharmacologia**, 31, n. 4, p. 305-320, Aug 3 1973. Review.