

# MEDICIÓN DEL TRANSPORTADOR DE LACTATO EN ADOLESCENTES CON SOBREPESO QUE REALIZARON RUTINAS DE EJERCICIO DIFERENTES

Díaz Campos Marcos Oswaldo (1), Salvador Saenz Herrera (2), Pérez-Vázquez Victoriano (3), Vargas-Ortiz Katya (4).

1 [Licenciatura Médico Cirujano, Departamento de Medicina y Nutrición, Campus León, Universidad de Guanajuato]  
[moswaldodc@hotmail.com]

2 [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato]  
[darksalvador\_1988@hotmail.com]

3 Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato]  
[vicpe@yahoo.com]

4 Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato]  
[k.vargasortiz@ugto.mx]

## Resumen

**Objetivo:** Medir por medio de la técnica Western Blot el co-transportador de lactato-proton MCT1 en muestras de músculo esquelético de adolescentes con sobrepeso; un grupo sometido a ejercicio de pesas y otro a ejercicio aeróbico. **Material y Métodos:** Los participantes de ambos grupos entrenaron 3 veces por semana en días no consecutivos. El entrenamiento fue personalizado y progresivo por 12 semanas. Para cuantificar el contenido de MCT1 antes y después de la intervención se utilizó el método Western Blot. **Resultados:** El grupo que realizó ejercicio de pesas disminuyó el contenido de MCT1 un 6%, el grupo que realizó ejercicio aeróbico aumento 20% el contenido de MCT1. La disminución de MCT1 en el grupo de pesas no era la esperada, sin embargo, no hay algún otro protocolo publicado que estudie a adolescentes con sobrepeso. Además de que el tamaño de muestra es muy pequeño para encontrar alguna significancia estadística.

## Abstract

**Objective:** Measure by Western Blot the content of MCT1 co-transporter in skeletal muscle samples of overweight adolescents, one group with exercise of weights and another with aerobic exercise. **Materials and Methods:** Participants of both groups trained 3 times per week on non-consecutive days. The training was personalized and progressive for 12 weeks. The content of MCT1 before and after the intervention was quantified by Western Blot method. **Results:** The group that exercised with weights decreased the MCT1 content by 6%, the group that performed aerobic exercise increased 20%. The decrease in MCT1 in the group of weights was not as expected, however, there is no other published protocol that studies overweight adolescents; in addition, the size of the sample is too small to find statistical significance.

## INTRODUCCIÓN

### Transportador de lactato MCT1

El transporte del lactato plasmático generado en actividades anaeróbicas se lleva a cabo a través de los co-transportadores de monocarboxilatos (MCTs), éstos son proteínas que facilitan el transporte del lactato a través de la membrana del sarcolemal y mitocondrial de la célula [1,2]. La isoforma MCT1 se expresa predominantemente en músculo oxidativo, facilita el consumo y la oxidación del lactato en la mitocondria de las fibras musculares oxidativas durante y después del ejercicio [3]. Se ha observado que el contenido de MCT1 incrementa con el ejercicio en adultos sanos y con diabetes [4–6]. Una técnica empleada para determinar el contenido de esta proteína es el Western Blot.

### Western Blot

Western Blot es una técnica analítica que permite la separación y detección proteínas específicas dentro de una muestra biológica, descrito por primera vez por Towbin [7]. La especificidad de la técnica se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés [7,8]. En la presente investigación se utilizó Western blot para comparar semi-cuantitativamente el efecto de dos tipos de entrenamiento sobre el contenido de la proteína MCT1 del músculo de adolescentes sedentarios con sobrepeso.

El objetivo fue medir por medio de la técnica Western Blot al MCT1 en muestras de músculo esquelético de adolescentes con sobrepeso, un grupo sometido a ejercicio de pesas y otro a ejercicio aeróbico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio comparando 2 tipos de entrenamiento en adolescentes diagnosticados con sobrepeso de acuerdo con su IMC. A ambos grupos se les tomó una biopsia muscular inicio y término de la intervención. Es de destacar que la intervención y las biopsias de los participantes ya se habían realizado desde años previos [9], para el presente protocolo se trabajó con las muestras almacenadas.

Los participantes de ambos grupos entrenaron 3 veces por semana en días no consecutivos. El entrenamiento fue personalizado y progresivo por 12 semanas. El grupo de entrenamiento de resistencia realizó ejercicios para fortalecer los principales grupos musculares cada día, con 10 min de calentamiento tanto al inicio de la sesión como al final de esta. Fueron 11 ejercicios de 12 repeticiones con aumento progresivo de peso.

Los participantes del grupo de entrenamiento aeróbico se ejercitaron en bicicleta fija con una intensidad y duración que aumentó gradualmente trabajando a partir de la quinta semana, con una intensidad 70-80%FCM (frecuencia cardiaca máxima) (determinada por prueba de esfuerzo) durante 40 minutos. La frecuencia cardiaca de los sujetos se corroboró minuto a minuto con un monitor portátil (Polar RS400SD, Finlandia). Los participantes realizaban 10 min de calentamiento antes de comenzar la sesión, así como 10 min de enfriamiento.

Para cuantificar el contenido de MCT1 antes y después de la intervención se utilizó el método Western Blot.

Preparación de la muestra: A las muestras musculares obtenidas por la biopsia se extrajeron las proteínas el Sample Grinding Kit (GE Healthcare life sciences): el tejido fue homogenizado con la resina del kit utilizando

como disolvente el buffer de muestras (Tris HCl 0.5 M pH 6.8, 25% glicerol y 2% SDS), en seguida se centrifugaron a 16,000 RPM/10 min, el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteína total por el método de Bradford modificado [10,11].

**Electroforesis:** Se preparó un gel de acrilamida, utilizando una porción concentradora (4% de acrilamida) y otra de separación (10% de acrilamida), obteniendo el tamaño del poro adecuado para la búsqueda de nuestra proteína de interés MCT1 de 41 kDa. En cada carril se cargaron de 45 µg de proteína. Al primer carril siempre le agregó 3.5 µl de marcador de peso molecular, es una mezcla de proteínas purificadas de peso molecular conocido, se utilizan para verificar si la proteína de interés está dentro del rango de tamaño apropiado [10]. En el resto de los carriles se cargaron proteínas correspondientes con los adolescentes incluidos en nuestro protocolo.

La electroforesis permite separar las proteínas de la muestra por su tamaño y peso molecular difundiéndose a través de la membrana, quedando en la porción superior del gel la de mayor tamaño y las de menor tamaño en la parte inferior. Clasificando así nuestra proteína de interés en una fila específica del gel. Se inició la electroforesis a 80 Volts durante 15-20 min para concentrar las proteínas de las muestras, posteriormente se aumentó a 140 Volts aproximadamente por 90 min esperando a que las proteínas recorrieran todo el gel [12].

**Transferencia:** Una vez la electroforesis del gel terminó, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa.

Para una transferencia efectiva de las proteínas, es necesario un estrecho contacto entre el gel y la membrana, evitando las burbujas y la manipulación inadecuada de la membrana para una adecuada transferencia. Previamente a la transferencia, tanto el gel como la membrana se equilibran en una solución buffer durante el procedimiento. Una clave importante de esta parte del procedimiento es no permitir un sobrecalentamiento durante la transferencia. Es aconsejable utilizar el buffer frío, en un sistema de refrigeración o hacer la transferencia en una cámara fría, rodeada en su totalidad en hielo. La transferencia se realizó a 120 Volts por 100 minutos [13].

**Bloqueo de la membrana:** Su función es reducir los lugares de unión no específicos al anticuerpo. En el presente protocolo se utilizó como solución de bloqueo 10 ml de TBS-Tween (buffer trisalino con Tween) con 200µl de leche por 4 horas, posteriormente se realizaron 3 lavados con TBS-Tween (15'-10'-10') [10].

**Anticuerpo primario:** La técnica de Western blot emplea comúnmente el sistema de inmunodetección indirecta. En este método se emplea un anticuerpo para localizar la proteína de interés. El anticuerpo primario reconoce el epítipo específico de la proteína que se está buscando, en este caso se utilizó anticuerpo monoclonal de ratón contra MCT1 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) por 12 horas.

**Lavado:** Se realizaron 3 lavados (15'-10'-10') con TBS-Tween para eliminar el anticuerpo primario no unido.

**Anticuerpo Secundario:** Se adiciona un anticuerpo secundario m-IgGκ BP-HRP recombinante de ratón marcado con que se unirá de forma específica al anticuerpo primario. (1:6000, Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA) por 90 minutos.

**Lavado:** Se realizó 3 lavados con TBS-Tween (15'-10'-10') para eliminar el anticuerpo secundario no unido.

**Revelado:** Se utilizó el método de quimioluminiscencia (Western Ligthning™ Plus-ECL; Perkin Elmer. INC.; USA) para detectar la proteína blanco (MCT1). Se combinaron 200 µl de luminol con 200µl de un agente oxidante, está reacción produce luz (radiación), la preparación se vertió sobre en la membrana, se unió al inmunocomplejo formado por el anticuerpo primario y secundario. La membrana se introdujo al equipo (Fotodocumentador ChemiDoc™ MP, USA) que detecta las bandas de luz de la proteína, obteniendo así las imágenes de la presencia de la proteína (MCT1) blanco (Imagen 1). Posteriormente se realizó la incubación

de anticuerpo primario contra la proteína tubulina sobre la membrana, utilizando está como nuestro control de carga. Siguiendo el mismo proceso que se describió con anterioridad a partir de la incubación del anticuerpo primario.

El presente protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación y de Ética del Departamento de Ciencias Médicas, y por el Comité de Investigación del Hospital General Regional de León. Los participantes firmaron un consentimiento informado y en todo momento se tomaron en cuenta y respetaron los derechos de los participantes, así como la confidencialidad de sus datos.

Las imágenes de los resultados del Western Blot fueron analizadas con el software ( Image Lab 6.0.1, de BioRad) arrojando los valores de densitometria de cada una de las muestras. Se realizó un análisis descriptivo de los datos, se obtuvo la relación MCT1/ tubulina y los valores se normalizaron. Por el tamaño de la muestra se realizó la prueba de Wicolxon de grupos dependientes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron 8 adolescentes en total, 4 que realizaron ejercicio de pesas, y 4 que realizaron ejercicio aeróbico.

Como se muestra en la Imagen 1, el grupo que realizó ejercicio de pesas disminuyó el contenido de MCT1 un 6%, mientras que el grupo que realizó ejercicio aeróbico aumentó el contenido de MCT1 un 20%, (diferencias estadísticamente no significativas). El proceso de eliminación del lactato está a cargo por las isoformas de los co-transportadores de monocarboxilatos, este proceso puede tomar varias rutas: ser difundido a músculos vecinos con mayor capacidad oxidativa, dirigirse a músculos donde gradiente de concentración láctica sea menor o circular por el torrente sanguíneo [2,6]. El lactato puede entrar a las células hepáticas donde nuevamente es oxidado a piruvato y convertido a glucosa por la vía de la gluconeogénesis y liberada al torrente sanguíneo (Ciclo de Cori) [14].

Diversos autores reportan en la literatura que individuos sometidos a un entrenamiento ya sea de ejercicio de pesas o ejercicio aeróbico, su capacidad de eliminación del lactato se ve aumentada gracias a que aumenta la presencia del MCT1 en la célula cabe mencionar que los estudios se realizaron en pacientes diabéticos, deportistas en la edad adulta [3–6,15].

En el presente protocolo se encontró que los individuos sometidos a una intervención con ejercicio de pesas disminuyeron la presencia de MCT1, no así los individuos sometidos a una intervención de ejercicio aeróbico, cuya presencia de MCT1 aumentó. La disminución de MCT1 en el grupo de pesas no era la esperada, sin embargo, no hay algún otro protocolo publicado que estudie a adolescentes con sobrepeso. Además de que el tamaño de muestra es muy pequeño para encontrar alguna significancia estadística.

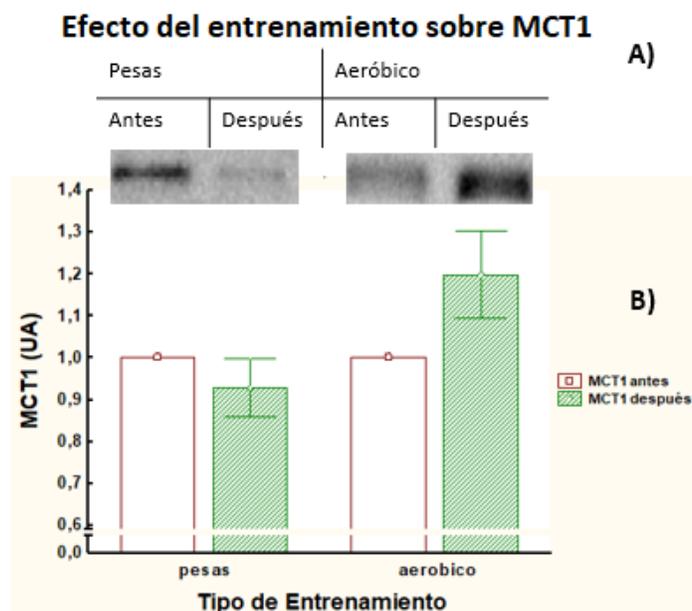


IMAGEN 1: a) Western Blot representativo del contenido de MCT1;  $\alpha$ -tubulina fue utilizada como control de carga.

b) Nivel de expresión de MCT1 por grupo de entrenamiento antes y después de 12 semanas de intervención. Datos expresados en Media  $\pm$  EE

Otras técnicas para poder identificar una proteína especifican son: ELISA, espectrometría de masa, cromatografía. Sin embargo, Western blot es altamente sensible, aunque la cantidad de proteína blanco sea muy poca (>10 ng), además de ser una prueba muy específica dado que los anticuerpos específicos muestran afinidad por una proteína específica, el proceso puede detectar selectivamente una proteína diana en una mezcla con miles de proteínas diferentes [10].

## CONCLUSIONES

MCT1 tiene un papel muy importante en el metabolismo del lactato, en el presente estudio los adolescentes que realizaron ejercicio aeróbico, el contenido de MCT1 aumento, los adolescentes que realizaron ejercicio de pesas disminuyó, sin embargo, los datos no alcanzaron significancia estadística por el tamaño de la muestra. La elaboración del presente protocolo permitió corroborar que el Western blot es una técnica muy útil para la detección de proteínas ya que permite al usuario identificar, separar y cuantificar la proteína de interés.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato por su apoyo en la creación y estímulo a este tipo de proyectos, agradezco al Departamento de Ciencias Médicas por haberme recibido en mi estancia de verano y el trato excelente de todo su personal. Finalmente agradezco al Dra. Katya Vargas Ortiz y al Dr. Victoriano Pérez Vázquez por su apoyo incondicional y orientación para el desarrollo de este trabajo.

## REFERENCIAS

- [1] Allen SE, Holm JL.; 2008; Lactate: Physiology and clinical utility. *J Vet Emerg Crit Care*;18:123–32. doi:10.1111/j.1476-4431.2008.00286.x.
- [2] Ferguson BS, Rogatzki MJ, Goodwin ML, Kane DA, Rightmire Z, Gladden LB.; 2018; Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. vol. 118. Springer Berlin Heidelberg; doi:10.1007/s00421-017-3795-6.
- [3] Dubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC, Brooks G a.; 2000; Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*;278:571–9. doi:0193-1849/00.
- [4] Petersen C, Nielsen MD, Andersen ES, Basse AL, Isidor MS, Markussen LK, et al; 2017; MCT1 and MCT4 Expression and Lactate Flux Activity Increase during White and Brown Adipogenesis and Impact Adipocyte Metabolism. *Sci Rep*;7:1–13. doi:10.1038/s41598-017-13298
- [5] Juel C, Holten MK, Dela F.;2004; Effects of strength training on muscle lactate release and MCT1 and MCT4 content in healthy and type 2 diabetic humans. *J Physiol*;556:297–304. doi:10.1113/jphysiol.2003.058222.
- [6] Cupeiro R, Pérez-Prieto R, Amigo T, Gortázar P, Redondo C, González-Lamuño D.;2016; Role of the monocarboxylate transporter MCT1 in the uptake of lactate during active recovery. *Eur J Appl Physiol*;116:1005–10. doi:10.1007/s00421-016-3365-3.
- [7] Towbin H, Staehelin T, Gordon J.;1979; Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* ;76:4350–4. doi:10.1073/pnas.76.9.4350.
- [8] Quilmes UN.;1981; TP6 : Western blot. *West Blot ;PRIMER VOL:1–7.*
- [9] Vargas-Ortiz K, Pérez-Vázquez V, Figueroa A, Díaz FJ, Montaña-Ascencio PG, Macías-Cervantes MH.;2018; Aerobic training but no resistance training increases SIRT3 in skeletal muscle of sedentary obese male adolescents. *Eur J Sport Sci* 18:226–34. doi:10.1080/17461391.2017.1406007.
- [10] Mahmood T, Yang PC.;2012; Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* ;4:429–34. doi:10.4103/1947-2714.100998.
- [11] Hammond JB, Kruger NJ.1988;The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* ;3:25–32. doi:10.1385/0-89603-126-8:25.
- [12] Towbin H. ;2011;Análisis de Proteínas: Electroforesis, Transferencia e Inmunoprecipitación. *Proc Natl Acad Sci* ;76:350–84. doi:10.1186/1750-1326-4-33.
- [13] GE Healthcare.;2011; Western blotting: Principles and Methods. *Trop Gastroenterol Off J Dig Dis Found* ;10:1–181. doi:10.1007/978-1-61779-289-2\_8.
- [14] NICOLA TAZZINI.;2016; Cori cycle: definition, biochemistry, function during exercise and cancer. 3 :6. <http://www.tuscany-diet.net/2016/12/18/cori-cycle/> (accessed July 24, 2018).
- [15] San-Millán I, Brooks GA;2018; Assessment of Metabolic Flexibility by Means of Measuring Blood Lactate, Fat, and Carbohydrate Oxidation Responses to Exercise in Professional Endurance Athletes and Less-Fit Individuals. *Sport Med* ;48:467–79. doi:10.1007/s40279-017