



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**



Juan Bordon Orsi

**TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATO 1 E 4 (MCTs) EM MÚSCULO
OXIDATIVO DE CAMUNDONGOS APÓS CORRIDA MÁXIMA EM INTENSIDADE
DE VELOCIDADE CRÍTICA**

Limeira
2021



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS**



Juan Bordon Orsi

**TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATO 1 E 4 (MCTs) EM MÚSCULO
OXIDATIVO DE CAMUNDONGOS APÓS CORRIDA MÁXIMA EM INTENSIDADE
DE VELOCIDADE CRÍTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências do Esporte à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas.

Orientador(a): Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto

Coorientador: Dr. Pedro Paulo Menezes Scariot

Limeira
2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

Or8t Orsi, Juan Bordon, 2000-
Transportadores de monocarboxilato 1 e 4 (MCTs) em músculo oxidativo de camundongos após corrida máxima em intensidade de velocidade crítica / Juan Bordon Orsi. – Limeira, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Fúlvia de Barros Manchado Gobatto.
Coorientador: Pedro Paulo Menezes Scariot.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Músculo esquelético. 2. Velocidade crítica. I. Gobatto, Fúlvia de Barros Manchado, 1980-. II. Scariot, Pedro Paulo Menezes, 1989-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Monocarboxylate 1 and 4 transporters (MCTs) in mouse oxidativo muscle after maximal running at critical speed intensity

Titulação: Bacharel em Ciências do Esporte

Banca examinadora:

Emanuel Elias Camolese Polisel

Data de entrega do trabalho definitivo: 16-12-2021

Autor: Juan Bordon Orsi.

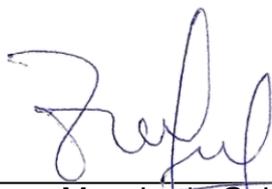
Título: Transportadores de monocarboxilato 1 e 4 (MCTs) em músculo oxidativo de camundongos após corrida máxima em intensidade de velocidade crítica.

Natureza: Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências do Esporte.

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas.

Aprovado em: 16/12/2021.

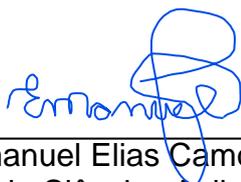
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto (Orientadora) – Presidente
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

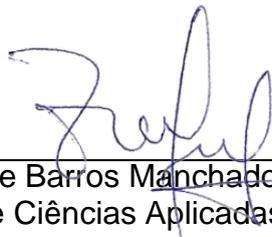


Prof. Dr. Pedro Paulo Menezes Scariot – (Coorientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)



Prof. Me. Emanuel Elias Camolese Polisel – Avaliador
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da monografia aprovada.



Profa. Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto (Orientador(a))
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Dedico esta monografia aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem na realização de todos os meus sonhos, não importando quais os seriam.

AGRADECIMENTOS

A produção deste trabalho só seria possível com o apoio de alguns interventores. Portanto, pretendo agradecer a todos que participaram e me ampararam ao longo de todos os processos desse Trabalho de Conclusão de Curso. Desta forma, gostaria de agradecer a Deus por ter me capacitado; aos meus pais, que, além de me instruírem valores como responsabilidade, comprometimento, dedicação e respeito, sempre serviram de inspiração; a minha Professora Dra. Fúlvia de Barros Manchado Gobatto por sua disponibilidade, confiança e complacência, além de guiar e orientar o presente projeto; a equipe de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Aplicada ao Esporte – LAFAE pelo acolhimento e beneficência e aos meus amigos, Cauê Goi, Eloisa Brok, Matheus Rocha e Saulo Gabriel, por passarem por todos os desafios ao meu lado.

Em especial, gostaria de destacar meus agradecimentos ao meu coorientador Dr. Pedro Paulo Menezes Scariot, que, desde meus primeiros contatos com o ambiente laboratorial, me proporcionou todo o suporte necessário, através de muitos debates e ensinamentos que levarei para toda a vida.

BORDON ORSI, Juan. Transportadores de monocarboxilato 1 e 4 (MCTs) em músculo oxidativo de camundongos após corrida máxima em intensidade de velocidade crítica. 2021. 31. Trabalho de Conclusão de Curso Ciências do Esporte. – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2021.

RESUMO

O presente estudo objetivou determinar o conteúdo proteico do transportador de monocarboxilato 1 e 4 (MCT-1 e MCT-4) em músculo oxidativo (sóleo) de camundongos submetidos a corrida máxima em intensidade de velocidade crítica (V_{crit}), correlacionando-os com o tempo de manutenção de esforço em intensidade individualizada de velocidade crítica. Para isso, 14 camundongos C57BL/6J foram submetidos ao protocolo para identificação da V_{crit} e capacidade de corrida anaeróbia (CCA) e, posteriormente, a uma corrida até a exaustão na intensidade individualizada de V_{crit} , com obtenção de materiais biológicos logo após esse esforço. Para possibilitar as análises moleculares comparativas, mesmo número de animais ($n=14$) permaneceram em repouso, sendo considerados o grupo controle. A V_{crit} e CCA do grupo experimental foi, respectivamente, $21,3\pm 0,9$ m.min⁻¹ e $8,4\pm 2,0$ m, com média de $R^2= 0,99\pm 0,002$, notabilizando alta confiabilidade na determinação desses parâmetros. Os animais que foram submetidos à corrida até a exaustão em intensidade de V_{crit} obtiveram o tempo limite (t_{lim}) de 1703 ± 133 s (~28min). No que diz respeito a determinação protéica das MCT1 e 4 obtido no músculo sóleo, não houve diferença entre os grupos exercitado e controle. Não foram observadas correlações significativas entre t_{lim} e os conteúdos das MCT1 ($r=0,08$, $p=0,77$) e MCT4 ($r=-0,31$, $p=0,28$). A partir dos resultados obtidos é possível concluir que apenas uma sessão de exercício em velocidade crítica até a exaustão não é capaz de modular o conteúdo protéico de MCT-1 e MCT-4 em músculo esquelético oxidativo (sóleo). Ademais, o tempo de exaustão na intensidade de V_{crit} não foi associado ao conteúdo protéico das MCTs.

Palavras-chave: Velocidade crítica. Tempo limite. Análises moleculares. Músculo sóleo.

BORDON ORSI, Juan. Transportadores de monocarboxilato 1 e 4 (MCTs) em músculo oxidativo de camundongos após corrida máxima em intensidade de velocidade crítica. 2021. 31. Trabalho de Conclusão de Curso Ciências do Esporte. – Faculdade de Ciências Aplicadas. Universidade Estadual de Campinas. Limeira, 2021.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the protein content of monocarboxylate transporter 1 and 4 (MCT-1 and MCT-4) in oxidative muscle (soleum) of mice submitted to maximum running at critical velocity intensity (CV), correlating them with time maintenance of effort at individualized intensity of critical velocity. For this, 14 C57BL/6J mice were submitted to the protocol for identification of CV and anaerobic running capacity (ARC) and, subsequently, to a run to exhaustion in the individualized CV intensity, with biological materials obtained soon after this effort. To enable comparative molecular analyses, the same number of animals (n=14) remained at rest, being considered the control group. The CV and ARC of the experimental group were, respectively, 21.3 ± 0.9 m.min⁻¹ and 8.4 ± 2.0 m, with a mean of $R^2 = 0.99 \pm 0.002$, noting high reliability in the determination of these parameters. The animals that were run to exhaustion at CV intensity had a time limit of 1703 ± 133 s (~28min). Regarding the protein determination of MCT1 and 4 obtained in the soleus muscle, there was no difference between the exercised and control groups. No significant correlations were observed between time limit and the contents of MCT1 ($r=0.08$, $p=0.77$) and MCT4 ($r=-0.31$, $p=0.28$). From the results obtained, it is possible to conclude that only one exercise session at critical velocity until exhaustion is not able to modulate the protein content of MCT-1 and MCT-4 in oxidative skeletal muscle (soleus). Furthermore, the exhaustion time in CV intensity was not associated with the protein content of the MCTs.

Keywords: Critical velocity. Time Limit. Molecular analysis. Soleous muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Exemplo representativo da relação linear entre distância vs. tempo limite para determinação da velocidade crítica e capacidade de corrida anaeróbia.....	15
Figura 2	Resumo das etapas realizadas no processo de transferência. A: Gel foi gentilmente colocado sobre a membrana. B: Um papel filtro umedecido em água destilada foi posto sobre o gel e com leve pressão utilizando um rolinho foram retiradas possíveis bolhas. C: Eléctrodo revestido de cobre foi posto sobre o papel filtro e um rolinho novamente foi usado para garantir a aderência entre as camadas. D: O kit de transferência foi inserido no equipamento iBlot® 2 Dry Blotting System. E: Uma última camada (absorbent pad) foi colocada sobre o eletrodo de cobre. F: A transferência foi executada utilizando a programação (p3) durante um tempo total de 7 minutos em voltagem de 20V.....	17
Figura 3	Exemplo de uma membrana submetida à leitura por fluorescência em 700nm para obtenção do total protein stain...	18
Figura 4	Comparação entre o conteúdo proteico de MCT-1 e MCT-4 em músculo sóleo de animais controle e exercitado.....	19
Figura 5	Correlações entre tempo de exaustão (tlim) em intensidade equivalente à Vcrit, e conteúdo protéicos de MCT-1 (Painel A) e MCT-4 (Painel B) em músculo sóleo, investigadas por produto-momento de Pearson.....	20

Figura 6 Exemplo da relação entre a transposição de lactato músculo-
corrente sanguínea e corrente sanguínea-tecido muscular
(MCT-4 e MCT-1 respectivamente) e tempo limite..... 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Conteúdos proteicos de MCT-1 e MCT-4 em músculo sóleo para grupos Controle e Exercitado.....	21
Tabela 2	Correlações entre MCT-1 e MCT-4 com Velocidade Crítica e Capacidade de Corrida Anaeróbia.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCA	Capacidade de Corrida Anaeróbia
H⁺	Hidrogênio
MCTs	Transportadores de Monocarboxilatos
MCT-1	Transportadores de Monocarboxilato 1
MCT-4	Transportadores de Monocarboxilato 4
MFEL	Máxima Fase Estável de Lactato
mRNA	RNA mensageiro
tlim	Tempo Limite
Vcrit	Velocidade Crítica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos.....	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1	Animais e local.....	15
2.2	Desenho experimental	16
2.3	Protocolo de velocidade crítica.....	17
2.4	Exercício agudo em intensidade de corrida equivalente à Vcrit.....	17
2.5	Eutanásia e obtenção de material biológico	17
2.6	Processamento dos tecidos	18
2.7	Mensuração dos conteúdos proteicos de interesse por Western Blotting	18
2.8	Análise estatística	21
3	RESULTADOS	21
4	DISCUSSÃO	23
5	CONCLUSÃO.....	26

1 INTRODUÇÃO

O exercício físico é compreendido como um importante modulador de vias de sinalização molecular, capaz de gerar respostas benéficas aos diversos sistemas biológicos do organismo (PEREZ DE HEREDIA et al., 2010; ROCHA, 2007; HON et al., 2002; LIN et al., 2002). Entretanto, tanto as respostas observadas frente aos esforços agudos, como as adaptações promovidas pelo treinamento físico (i.e., aplicação crônica), são dependentes de fatores como a intensidade, volume, tipo de exercício e razão esforço:pausa, dentre outros (ISSURIN, 2010; MATVEYEV, 1981, KINDERMANN et al., 1979). Especificamente no que se refere à intensidade do exercício, embora muitas vezes menosprezada em programas de treinamento, essa é considerada fundamental para que os objetivos dessas intervenções sejam atingidos com sucesso.

Há grande interesse em encontrar a intensidade de esforço individualizada na qual o organismo apresenta máximo equilíbrio fisiológico, permitindo a execução do exercício por um longo período de tempo. Esse estado de equilíbrio pode ser avaliada por monitoramento de um metabólito “chave” nesse processo, o lactato, que é produzido pela via anaeróbia láctica no músculo sobretudo durante esforços em intensidade superior ao limiar anaeróbio. Após ser produzido, esse metabólito é liberado na corrente sanguínea (BROOKS et al., 2018), podendo ser captado por outros tecidos, inclusive por músculos menos ativos durante o esforço. Vale mencionar que o lactato, uma molécula originalmente considerada resíduo metabólico, agora está associado com uma série de funções fisiológicas importantes tais como molécula sinalizadora, fonte energética (BROOKS et al., 2020) e substrato gliconeogênico, controle hipotalâmico da ingestão de energia (MCCARTHY et al., 2020) e reparo tecidual (GHANI et al., 2004).

O transporte de lactato é auxiliado por proteínas específicas denominadas transportadores de monocarboxilato (MCTs). Dentre as várias isoformas desses transportadores (THOMAS et al., 2012), no caso da transposição de lactato músculo-corrente sanguínea e corrente sanguínea-tecido muscular, as MCTs 4 e 1 são, respectivamente, as atuantes no processo. Enquanto o MCT1 está associado à captação de lactato e íons hidrogênio especialmente em fibras oxidativas, a MCT4 vem sendo relacionada com a extrusão destes metabólitos, principalmente por fibras musculares esqueléticas glicolíticas (THOMAS et al., 2012; BONEN et al., 2000; MCCULLAGH et al., 1996). Além de significantes para a manutenção do equilíbrio em

exercício físico, a relação dos MCTs e transporte de lactato vem sendo recentemente investigada em diferentes âmbitos, inclusive em casos patológicos (SANDFORTH et al., 2020, AVNET et al., 2020, KHAN et al., 2020).

O protocolo padrão-ouro para a identificação da máxima intensidade de equilíbrio fisiológico durante o exercício é denominado Máxima Fase Estável de Lactato (MFEL) (FAUDE et al., 2009, BILLAT et al., 2003, BENEKE et al., 1995). Embora muito reconhecido e válido, esse modelo de avaliação necessita de procedimentos invasivos como coleta de amostras sanguíneas, além de muitas sessões caracterizadas por esforços contínuos de 30min, o que limita sua aplicabilidade. Por outro lado, há outras maneiras mais simples que buscam, por estratégias não invasivas, identificar a zona de equilíbrio aeróbia-anaeróbia. Com apenas um ergômetro e um cronômetro, o protocolo não invasivo de potência crítica (Pcrit) é capaz de estimar a intensidade equivalente à máxima capacidade aeróbia e também, embora de modo menos preciso, inferir informações sobre a capacidade anaeróbia. Por sua elevada aplicabilidade e característica não invasiva, a proposta inicialmente sugerida por Monod e Scherrer (1965) passou a ser aplicada a outros tipos de exercício e modalidades esportivas como tênis de mesa, natação (ZAGATTO et al., 2008, FUKUDA et al., 2011, PAPOTI et al., 2013), além de adotado para avaliar roedores em exercício de natação (MARANGON et al., 2002, CHIMIN et al., 2009, GOBATTO et al., 2013) e corrida em esteira rolante (BILLAT et al., 2005, MANCHADO-GOBATTO et al., 2010, MANCHADO-GOBATTO et al., 2012). No último caso, a velocidade crítica (Vcrit), análoga à Pcrit sugerida pelo modelo original, vem sendo aplicada, com sucesso, por grupos de pesquisa que investigam os efeitos de exercícios agudos e crônicos em modelo animal, como avaliação da capacidade aeróbia (BILLAT et al., 2005, SCARIOT et al., 2019, POLISEL et al. 2021, GOBATTO et al., 2008).

Para alguns tipos de esforço, a potência crítica e seus análogos parecem superestimar em diferentes níveis percentuais, levando em consideração os distintos perfis de pessoas, a intensidade equivalente à MFEL (PRINGLE e JONES, 2001, SMITH e JONES, 2001, DAKERLE et al., 2003). Conceitualmente, a Pcrit demarca o limite inferior do domínio de exercício de intensidade severa, ficando ligeiramente acima da intensidade do limiar anaeróbio (GAESSER e POOLE, 1996; JONES et al., 2010). Mesmo que, teoricamente, a literatura indique que o exercício na intensidade de Pcrit (ou Vcrit) poderia ser mantida por "um tempo muito longo sem fadiga" (JONES

et al., 2010), na prática sabe-se que a manutenção do esforço nessa intensidade parece apresentar elevada variação inter indivíduos, podendo ser limitada por diferentes aspectos metabólicos e fisiológicos ainda não absolutamente compreendidos.

Com base na literatura supramencionada, bem como nas linhas de investigação de nosso grupo de pesquisa, acreditamos fortemente que os conteúdos proteicos de MCT 1 e 4 em músculo oxidativo estejam relacionados à estabilidade do organismo necessária para a manutenção por longo período, em esforços realizados em intensidade como a velocidade crítica.

1.1 Objetivos

De modo geral, esse trabalho objetiva determinar o conteúdo proteico de transportadores de monocarboxilato 1 e 4 em músculo oxidativo de camundongos após corrida máxima em intensidade de velocidade crítica, bem como investigar as possíveis correlações entre esses conteúdos com o tempo limite de corrida nessa intensidade individualizada.

Especificamente, pretendeu-se:

- Determinar o conteúdo proteico de MCT 1 e 4 em músculo sóleo de camundongos submetidos a corrida máxima em intensidade de velocidade crítica;
- Realizar comparações entre os conteúdos proteicos de MCTs de animais exercitados e animais em condições de repouso;
- Investigar as correlações entre os conteúdos proteicos de MCT 1 e 4 em músculo sóleo de camundongos e o tempo de manutenção do exercício (tempo limite) em intensidade correspondente à V_{crit} ;
- Identificar as possíveis correlações entre as capacidades aeróbia (V_{crit}) e anaeróbia (capacidade de corrida anaeróbia – CCA) com os conteúdos de MCT 1 e 4 após corrida máxima nessa intensidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e local

Para a execução desse projeto, foram utilizados os materiais biológicos (tecidos muscular esquelético) advindos de um estudo experimental desenvolvido

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

2.2 Desenho experimental

Aos sessenta dias de idade os animais foram recebidos pelo Biotério local, onde foram mantidos até os cento e cinquenta dias para atingirem idade alvo (150 dias). A partir dessa idade, foram adaptados à corrida em esteira rolante por um período de cinco dias. Posteriormente, os camundongos foram submetidos ao protocolo de velocidade crítica (quatro sessões de exercício contínuo até a exaustão), para determinação da V_{crit} e capacidade de corrida anaeróbia. Após 48 horas da última sessão do protocolo avaliativo, os camundongos foram submetidos à corrida em intensidade equivalente à V_{crit} individual, sendo o tempo limite de exercício registrado por um cronômetro. Imediatamente após o esforço, os roedores foram eutanasiados para a obtenção de materiais biológicos e posterior análise, conforme detalhamentos a seguir. Para permitir a análise comparativa entre os conteúdos proteicos de MCTs 1 e 4 no repouso e após de esforço, um grupo de animais de mesma idade e mantido em mesmas condições de alojamento foi eutanasiado sem executar a corrida na intensidade de V_{crit} .

2.3 Protocolo de velocidade crítica

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

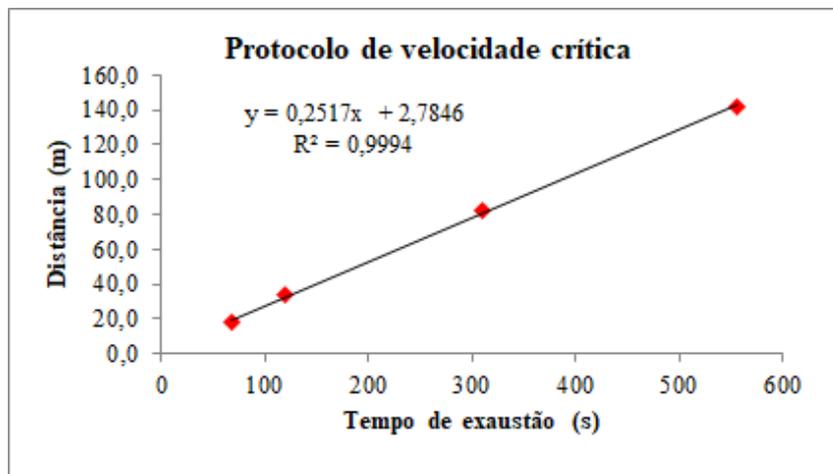


Figura 1: Exemplo representativo da relação linear entre distância vs. tempo limite para determinação da velocidade crítica e capacidade de corrida anaeróbia.

2.4 Exercício agudo em intensidade de corrida equivalente à Vcrit

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

2.5 Eutanásia e obtenção de material biológico

A eutanásia foi efetuada pelo método químico, por meio de administração letal intraperitoneal de tiopental sódico. Após a total perda dos reflexos, a toracotomia

foi efetuada. Amostras de músculo sóleo foram cirurgicamente removidas e rapidamente depositadas em nitrogênio líquido para evitar a degradação tecidual, sendo posteriormente armazenadas a uma temperatura de -80°C . Cabe destacar que todo os procedimentos experimentais, desde a retirada dos animais da gaiola, execução do exercício físico até contenção física para anestesia, foram cuidadosamente realizados com o intuito de minimizar o medo, a ansiedade e a apreensão dos animais.

2.6 Processamento dos tecidos

Os tecidos retirados foram homogeneizados em RIPA buffer o qual foi constituído dos seguintes componentes: 1% de Tris HCl (50mM), NaCl (150mM), EDTA (1mM), IGEPAL® CA-630 (1%), Deoxycholate (0,5%), SDS (0,1%) e 1% de inibidores de protease (Protease Inhibitor Cocktaile fostatase, cat# P8340, Sigma-Aldrich®) e de fosfatase (Fosfatase Inibidor Coquetel Set II, cat# US1524625-1SET, Calbiochem®). O volume utilizado de RIPA foi de 112 μL para o músculo sóleo. Após a homogeneização mecânica com pistilos, os tecidos ainda foram sonicados (Q55 Sonicator, Qsonica®, USA) durante 3 segundos (60%) com tubos sempre imergidos em gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000rpm em temperatura de 4°C (Centrifuge 5424 R, Eppendorf). Após isso, sempre em gelo, os sobrenadantes foram armazenados em freezer 80°C . Após lisados e armazenados, foram determinadas, por método colorimétrico (Bradford), volumes de solução de cada amostra, de forma a conter 40 μg de proteínas em volume não superior a 9 μL , já que 12 μL foi o volume máximo a ser utilizado para deposição em poços unitários de gel (sendo que 3 μL já estavam reservados para o volume de LDS buffer -Lithium dodecyl sulfate e Mercaptoethanol-1%).

2.7 Mensuração dos conteúdos proteicos de interesse por Western Blotting

Após a inclusão de 3 μL de solução LDS buffer - Mercaptoethanol (1%), as amostras foram aquecidas em boiler a 95°C por 10 minutos, mantidas em gelo por 5 minutos e centrifugadas por 10 segundos. Em seguida, 9 μL de cada amostra foi depositado em poços de gel de eletroforese (Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 15-well), em cuba contendo Tris-Glicina buffer. A primeira linha de cada gel foi reservada para

o padrão de peso molecular (Color-coded Prestained Protein Marker, Broad Range 11-250 kDa, cat#14208, Cell Signaling Technology). Ao final do carregamento dos poços, eletrodos foram introduzidos à cuba e a eletroforese foi iniciada utilizando equipamento específico (Electrophoresis Power Supply PowerPac 300 - Bio Rad) a 130V. Ao final do procedimento, tendo as proteínas corrido integralmente o gel, foi realizada a transferência das proteínas para a membrana (PVDF), com uso de equipamento Invitrogen (iBlot® 2 Dry Blotting System), com secagem e transferência em sete minutos (Figura 2). Logo após as proteínas serem transferidas do gel para as membranas, essas foram submetidas ao stain. Conforme ilustrado na figura 3, o procedimento determina o valor total de proteína "total stain" por fluorescência (Revert™ total protein stain kit), não necessitando, portanto, de controle interno na determinação das proteínas de interesse, trazendo com isso maior sensibilidade ao procedimento. Ao final, a leitura foi realizada em fotodocumentador (Odyssey Fc System, Li-COR).



Figura 2: Resumo das etapas realizadas no processo de transferência. **A:** Gel foi gentilmente colocado sobre a membrana. **B:** Um papel filtro umedecido em água destilada foi posto sobre o gel e com leve pressão utilizando um rolinho foram retiradas possíveis bolhas. **C:** Eléctrodo revestido de cobre foi posto sobre o papel filtro e um rolinho novamente foi usado para garantir a aderência entre as camadas. **D:** O kit de transferência foi inserido no equipamento iBlot® 2 Dry Blotting System. **E:** Uma última camada (absorbent pad) foi colocada sobre o eletrodo de cobre. **F:** A transferência foi

executada utilizando a programação (p3) durante um tempo total de 7 minutos em voltagem de 20V.

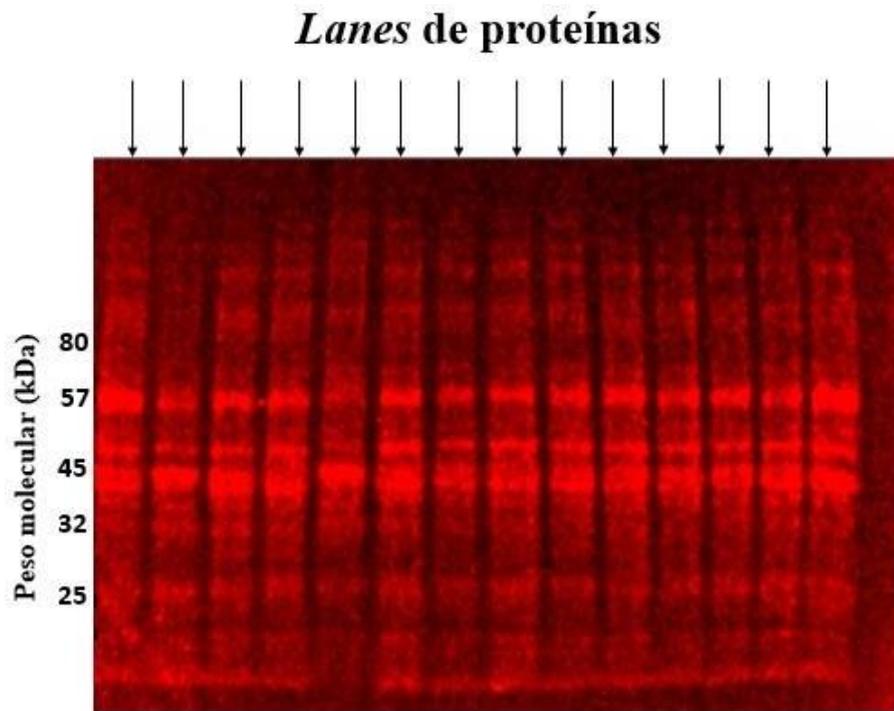


Figura 3: Exemplo de uma membrana submetida à leitura por fluorescência em 700nm para obtenção do total protein stain.

Após transferir o gel para a membrana, foi realizado o bloqueio em 1% leite em PBS (10mL PBS, 0,1g milk-NFDM) durante 1 hora. Imediatamente após o bloqueio, as incubações com anticorpos foram iniciadas. As membranas foram incubadas com 5% de leite em PBS-Tween por 1 hora em temperatura ambiente (para o anticorpo MCT4, cat # BS-2698R , Bioss), ou overnight a 4 ° C (para o MCT1, cat # BS-10249R, Bioss). Após isso foram realizadas duas lavagens rápidas com 10mL PBST, seguidas de outras quatro lavagens de 5 minutos com PBST. A ligação do anticorpo foi detectada usando Goat anti-Rabbit IgG H&L (IRDye 800CW) preadsorbed (cat# ab216773) a uma diluição de 1: 20.000 por 1 hora à temperatura ambiente em ausência de luz. Ao final, duas lavagens rápidas com PBST, seguida de 4x5min PBST e outras duas rápidas em PBS. A fluorescência foi detectada a 800 nm com o Odyssey Fc System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). A expressão da proteína foi normalizada dividindo o sinal do anticorpo pelo fator de normalização da lane.

2.8 Análise estatística

Todos resultados obtidos estão apresentados como média \pm erro padrão da média. A normalidade dos dados foi testada por Shapiro-Wilk e a homogeneidade, por teste Levene. Para a analisar as diferenças entre grupos (Controle vs Exercitado) utilizou-se teste t para amostra independentes. Correlações entre as variáveis foram investigadas por produto-momento de Pearson. O tamanho do efeito (effect size) para comparações entre grupos foi determinado pela fórmula: (média do grupo Controle - média do grupo Exercitado) / desvio padrão agrupado. Os valores de effect size de 0,2, 0,5 e 0,8 descrevem efeitos pequenos, moderados e grandes, respectivamente. Em todos os casos, o nível de significância foi pré-fixado em 5%.

3 RESULTADOS

A Vcrit e a CCA dos animais exercitados foi $21,3 \pm 0,9$ m.min⁻¹ e $8,4 \pm 2,0$ m, respectivamente. Todas as regressões lineares apresentaram elevados valores de R² ($0,99 \pm 0,002$), evidenciando uma elevada confiabilidade na determinação dos parâmetros aeróbio e anaeróbio advindos desse modelo. Para os animais que foram individualmente submetidos ao exercício de corrida em esteira rolante (n=14), em intensidade equivalente à Vcrit, o tlim foi de 1703 ± 133 s (~28min). Quanto à determinação do conteúdo proteico de MCT-1 e MCT-4 em músculo sóleo, não houve diferença entre o grupo exercitado e controle, como evidenciando na tabela 1 e figura 4.

Tabela 1: Conteúdos proteicos de MCT-1 e MCT-4 em músculo sóleo para grupos controle e exercitado.

	Controle	Exercitado	Comparações estatísticas	Effect Size
MCT-1	$0,7013 \pm 0,143$ (n=13)	$0,7083 \pm 0,138$ (n=13)	t=-0,03; p=0,97	0,013
MCT-4	$0,0215 \pm 0,002$ (n=11)	$0,0173 \pm 0,002$ (n=13)	t=1,60; p=0,12	0,657

Dados estão apresentados em média e erro padrão da média.

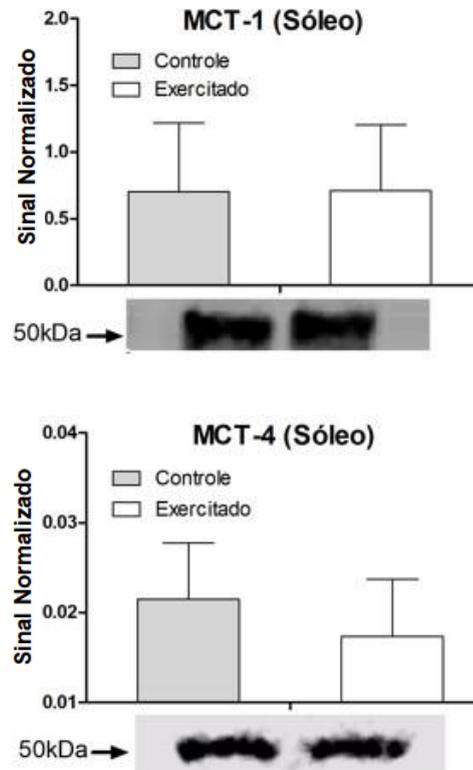


Figura 4: Comparação entre o conteúdo proteico de MCT-1 e MCT-4 em músculo sóleo de animais controle e exercitado.

Na tentativa de correlacionarmos o tempo limite em intensidade equivalente à V_{crit} , e os conteúdos proteicos de MCT-1 e MCT-4 na musculatura oxidativa sóleo, aplicamos o teste produto-momento de Pearson. Contudo, não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre o t_{lim} e os conteúdos de MCT1 ($r=0,08$, $p=0,77$), e MCT4 ($r=-0,31$, $p=0,28$) (figura 5).

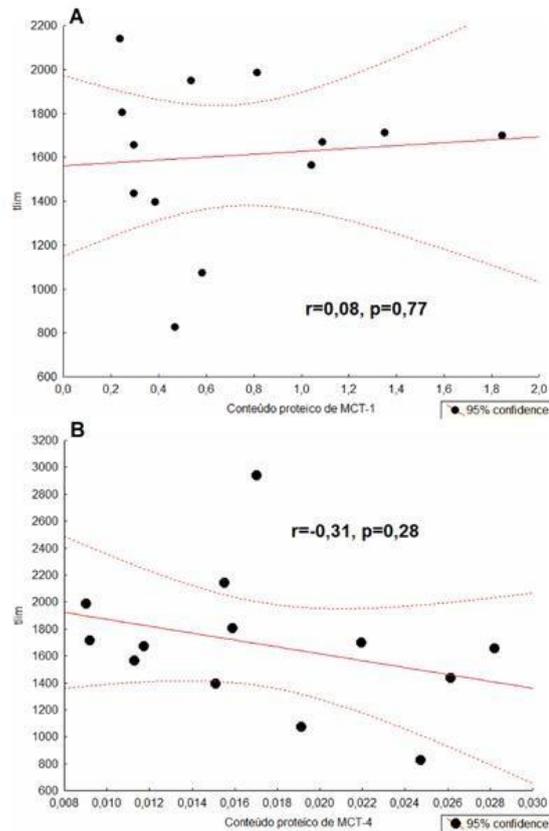


Figura 5: Correlações entre tempo de exaustão (tlim) em intensidade equivalente à Vcrit, e conteúdo proteico de MCT-1 (Painel A) e MCT-4 (Painel B) em músculo sóleo, investigadas por produto-momento de Pearson.

Como pode ser observado na tabela 2, não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre MCT-1 e MCT-4 com Vcrit e CCA.

Tabela 2: Correlações entre MCT-1 e MCT-4 com Vcrit e CCA (n=13).

	MCT-1		MCT-4	
Vcrit	p=0,33	r=0,29	p=0,71	r=0,11
CCA	p=0,52	r=-0,18	p=0,68	r=-0,12

4 DISCUSSÃO

Ao que sabemos este é o primeiro estudo que investigou repostas moleculares de proteínas envolvidas no transporte de lactato após um esforço até exaustão em intensidade de velocidade crítica. Os principais achados do nosso estudo foram que um esforço tlim não é capaz de modular o conteúdo proteico de MCT-1 e

MCT-4 em músculo sóleo, bem como um melhor tempo limite não é associado com o conteúdo proteico de MCT-1 e MCT-4.

Os valores médios de V_{crit} encontrados nesse estudo ($21,3 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$) vão ao encontro com os valores de V_{crit} apresentada na literatura. Em estudos empregando o protocolo que utilizamos, MANCHADO-GOBATTO et al. (2010) e MANCHADO-GOBATTO et al. (2012) reportaram valores de V_{crit} entre $22 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ a $26 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$. BILLAT et al. (2005) avaliaram camundongos corredores, relatando V_{crit} média de $18,0 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ para camundongos C57BL / 6J, o mesmo usado nesse estudo. A similaridade dos nossos resultados de V_{crit} com os reportados pela literatura demonstra que nosso protocolo foi bem aplicado. Alguns procedimentos executados em nosso projeto podem ter contribuído para os achados fidedignos, tais como, a familiarização dos animais com a esteira ergométrica, preparando-os para atividade subsequente, a realização dos testes no período noturno, como descrito por MANCHADO-GOBATTO et al. (2012) no qual os roedores estão em estado de vigília. Em nossos procedimentos não utilizamos o choque elétrico para estimular os animais a correr, pois poderia ocasionar estresse, gerando resultados diferentes tanto da V_{crit} quanto da análise molecular.

Quanto ao tlim, é coerente mencionar que exercício realizado em intensidade igual a V_{crit} é possível de sustentação por um longo período uma vez que a tal intensidade representa um limiar crítico para o domínio severo (POOLE et al., 1988; COOP et al., 2010). Indo ao encontro desse raciocínio, observamos que o tlim dos roedores na intensidade da V_{crit} foi equivalente a $1703,1 \text{ s}$ em média ($28,4 \text{ min}$). Beck et al. (2014) também submeteu ratos a exercício na intensidade de lactato mínimo, só que aplicado na natação, demonstrando tlim médio de $114,3 \text{ min}$. Espera-se, na teoria, que uma pessoa treinada consiga manter o exercício por volta de 40 minutos a 1 hora em exercício no limiar de anaeróbio (BILLAT et al., 2005; BECK et al. 2014), como relatado no estudo de Stegmann & Kindermann (1982). Já para pessoas não treinadas o tlim varia entre 20 a 30 minutos (MCLELLAN & JACOBS, 1989 & 1993; MEZZANI et al., 2010), o que corrobora com os nossos achados envolvendo o tlim dos nossos animais, já que esses roedores não foram submetidos a nenhum treinamento prévio e apresentaram o tlim médio de $28,4 \text{ min}$.

Tendo em vista que De ARAÚJO et al. (2015) reportaram aumento da expressão gênica de MCT-1 e MCT-4 em músculo oxidativo (sóleo) de camundongos logo após uma única sessão de natação realizado em intensidade aeróbia (MFEL),

acreditávamos ser possível visualizar maior conteúdo proteico desses MCTs em músculo sóleo em animais exercitados quando comparados à animais controles (sem nenhum estímulo). Em conjunto com os achados de De ARAUJO et al. (2015), nossos resultados demonstram que os níveis de mRNA não necessariamente refletem os perfis de expressão proteica.

As adaptações celulares logo após o estímulo ao exercício são executadas por conversões fisiológicas, caracterizadas pela detecção de um sinal, a transdução do sinal para o DNA, a transcrição de mRNA e, logo após, a tradução da proteína referente ao estresse sofrido. Contudo as variações espaciais e temporais dos mRNAs, bem como a disponibilidade local de recursos para a biossíntese de proteínas, influenciam fortemente a relação entre os níveis de proteínas e seus transcritos codificadores (LIU et al., 2016). Nesse sentido, Miller (2016) sugere que utilizar mRNA como principal variável, especialmente em estudos de treinamento físico, traz uma visão limitada das adaptações fisiológicas frente ao exercício físico.

Dessa forma, a ausência de diferença entre os grupos pode estar relacionada ao tempo de análise das proteínas após o estímulo do esforço. Embora a eutanásia dos animais tenha sido realizada imediatamente após o tlim, com o intuito de examinar elementos que contribuíram para a manutenção do esforço, torna-se necessário estudar momentos mais tardios após a exposição ao exercício, já que a relação entre proteína e mRNA pode acontecer em vários cenários, como estado estacionário, mudanças de estado de longo prazo e adaptação de curto prazo, demonstrando a complexidade da regulação da expressão gênica, especialmente após estímulos (LIU et al., 2016).

Assim, análises *time course* parecem ser relevantes para compreender como se dão os ajustes nas MCTs em algumas horas após o esforço em intensidade aeróbia. Com relação ao segundo objetivo do estudo, vale mencionar que um maior tlim poderia ser explicado por elevada capacidade muscular de realizar influxo (MCT-1) e efluxo (MCT-4) de lactato e íons hidrogênio com repercussões no equilíbrio ácido-básico em nível sistêmico (figura 6).

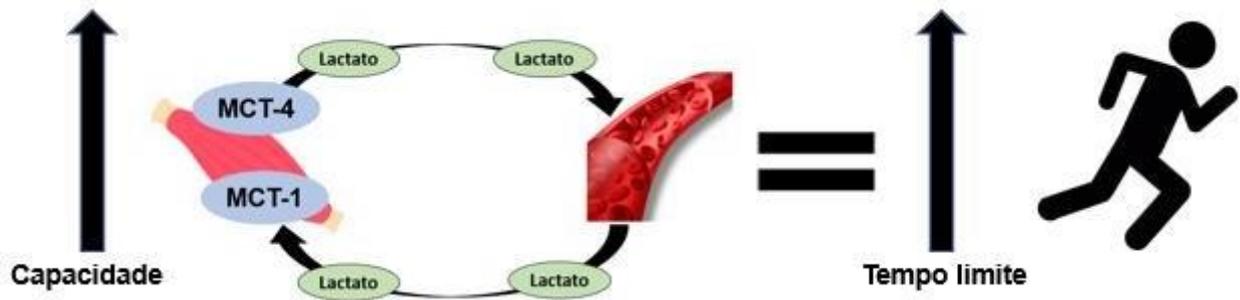


Figura 6: Exemplo da relação entre a transposição de lactato músculo-corrente sanguínea e corrente sanguínea-tecido muscular (MCT-4 e MCT-1 respectivamente) e tempo limite.

Apesar de não termos encontrado associação entre tlim e as MCTs, é importante relatar que a tolerância ao esforço é absolutamente dependente das MCTs. Diante disso, podemos supor que se o desenho experimental tivesse sido aplicado também com animais treinados (aumentando a heterogeneidade das amostras), os quais já possuem adaptações crônicas de elevados níveis de MCTs devido ao treinamento, talvez encontraríamos associações entre tlim e MCTs. Segundo Bonen (2000) houve aumento de mRNA de MCT-1 na porção vermelha do músculo tibial anterior, apenas três semanas após sessões crônicas de exercício.

Bonen (2001) observaram que a expressão de MCT-1 no tecido cardíaco em roedores aumentou com exercício físico, levando-os a crer que a expressão de MCT-1 e MCT-4 podem ser reguladas em músculos e isoformas específicas. Portanto, futuras investigações serão conduzidas na tentativa de compreender como outras isoformas de MCTs, em diferentes tecidos e em animais com diferentes status de treinamento, se associam com o tlim em esforços constantes e individualizados de corrida.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que uma sessão de exercício em intensidade individualizada de velocidade crítica (esforço até a exaustão) não é capaz de modular o conteúdo proteico de MCT-1 e MCT-4 em músculo sóleo. Além disso, o tempo de exaustão em corrida contínua realizada nessa intensidade não apresentou correlações significantes com o conteúdo proteico de MCT-1 e MCT-4, ao menos em relação ao músculo sóleo.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, G.G., TEIXEIRA, L.F.M., GOBATTO, C.A., MANCHADO-GOBATTO, F.B., REIS, I.G.M., CAPERUTO, L.C., PAPOTI, M., BORDIN, S., CAVAGLIERE, C.R., VERLENGIA, R. MCT1 and MCT4 kinetic of mRNA expression in different tissues after aerobic exercise at maximal lactate steady state workload. *Physiological Research (Print)*, v. 64, p. 513-522, 2015.
- AVNET S, LEMMA S, ERRANI C, FALZETTI L, PANZA E, COLUMBARO M, NANNI C, BALDINI N. Benign albeit glycolytic: MCT4 expression and lactate release in giant cell tumour of bone. *Bone*, v. 134, p. 115302., 2020.
- BECK, W.R., DE ARAUJO, G.G., SCARIOT, P.P.M., DOS REIS, I.G.M., GOBATTO, C.A. Time to exhaustion at anaerobic threshold in swimming rats: metabolic investigation. *Bratisl Lek Listy*, v.115(10), p.617-621, 2014.
- BENEKE R. Methodological aspects of maximal lactate steady state-implications for performance testing. *Eur J Appl Physiol*, v. 89, p.95-9, 1995.
- BILLAT, V.L., MOUISEL, E., ROBLOT, N., MELKI, J. Inter- and intrastrain variation in mouse critical running speed. *J Appl Physiol*, v.98, p.1258-6, 2005.
- BILLAT, V.L., SIVERENT, P., PY, G., KORALLSZTEIN, J-P., MERCIER, J. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Med*, v.33(6), p.407-26, 2003.
- BONEN, AREND. Lactate transporters (MCT proteins) in heart and skeletal muscles. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 32, n. 4, p. 778-789, 2000.
- BONEN, Arend. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *European journal of applied physiology*, v. 86, n. 1, p. 6-11, 2001.
- BROOKS, G. A. The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metab*, v.27, p.757–785, 2018.
- BROOKS, George A. Lactate as a fulcrum of metabolism. *Redox biology*, v. 35, p. 101454, 2020.
- CHIMIN, P. et al. Critical load during continuous and discontinuous training in swimming Wistar rats. *Motricidade*, v. 5, n. 4, p. 45-58, 2009.
- COPP, S. W., Hirai, D. M., Musch, T. I., & Poole, D. C. (2010). Critical speed in the rat: implications for hindlimb muscle blood flow distribution and fibre recruitment. *The Journal of physiology*, 588(24), 5077-5087.

- DEKERLE, J., BARON, B., DUPONT, L., VANVELCENAHAR, J., PELAYO, P. Maximal lactate steady state, respiratory compensation threshold and critical power. *Eur J Appl Physiol*, v.89, p.281–288, 2003.
- FAUDE, O., KINDERMANN, W., MEYER, T. Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med*, v.39(6), p.469-90, 2009.
- FUKUDA, D.H., SMITH, A.E., KENDALL, K.L., CRAMER, J.T., STOUT, J.R.. The Determination of Critical Rest Interval from the Intermittent Critical Velocity Test in Club-Level Collegiate Hockey and Rugby Players. *J Strength Cond Res*, v.25, p. 889-95, 2011.
- GAESSER, G.A., POOLE, D.C., 1996. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. *Exercise and sport sciences reviews* 24, 35-71.
- GHANI, Q. Perveen et al. Regulatory role of lactate in wound repair. *Methods in enzymology*, v. 381, p. 565-575, 2004.
- GOBATTO, C. A. G. C. A., de Mello Maria, M. A. R., de Mello, A. R., Papoti, M. P. M., & Voltarelli, F. A. V. F. A. (2008). Avaliações fisiológicas adaptadas à roedores: aplicações ao treinamento em diferentes modelos experimentais. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, 7(1), 137-147.
- GOBATTO, C. A. et al. Critical load estimation in young swimming rats using hyperbolic and linear models. *Comparative Exercise Physiology*, v. 9, n. 2, p. 85-91, 2013.
- HON, W.C., WILSON, M.I., HARLOS, K. et al. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature*, v. 417, p. 975-978, 2002.
- ISSURIN, V.B. New horizons for the methodology and physiology of training periodization. *Sports Med*, v. 40, p.189-206, 2010.
- JONES, A.M., Vanhatalo, A., Burnley, M., Morton, R.H., Poole, D.C., 2010. Critical power: implications for determination of $\dot{V}O_{2max}$ and exercise tolerance. *Medicine and science in sports and exercise* 42, 1876-1890.
- KHAN, A., VALLI, E., LAM, H., SCOTT, D.A., MURRAY, J., HANSEN, K.M. et al. Targeting metabolic activity in high-risk neuroblastoma through Monocarboxylate Transporter 1 (MCT1) inhibition. *Oncogene* (ahead of print), 2020.
- KINDERMANN, W., SIMON, G., KEUL, J. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, v.42, p. 25–34, 1979.

- LIN, J., WU, H., TARR, P.T. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, v.418, p.797-80, 2002.
- LIU, Yansheng; BEYER, Andreas; AEBERSOLD, Ruedi. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell*, v. 165, n. 3, p. 535-550, 2016.
- MANCHADO-GOBATTO, F.B., GOBATTO, C.A., CONTARTEZE, R.V.L., PAPOTI, M., ARAÚJO, G.G., MELLO, M.A.R. . Determination of critical velocity and anaerobic capacity of running rats. *J Exerc Physiol Online*, v. 13, p. 40-49, 2010.
- MANCHADO-GOBATTO, F.B., ARAÚJO, G.G., RIBEIRO, C., ARAUJO, M.B., MOTA, C.S. A., GOBATTO, C.A., MELLO, M.A.R. Effects of light-dark cycle manipulation on critical velocity and anaerobic running capacity in Wistar rats. *Comp Exerc Physiol (Print)*, v. 8, p. 71-78, 2012.
- MARANGON, L. et al. Utilization of na hyperbolic model for the determination of the critical load in swimming. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 34, n. 5, p. S149, 2002.
- MATVEYEV, L.P. Fundamental of sport training. Moscow: Progress Publisher; 1981.
- MCCARTHY, SETH F.; ISLAM, HASHIM; HAZELL, TOM J. THE EMERGING ROLE OF LACTATE AS A MEDIATOR OF EXERCISE-INDUCED APPETITE SUPPRESSION. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM*, V. 319, N. 4, P. E814-E819, 2020.
- MCCULLAGH, K. J. et al. Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, v. 271, n. 1, p. E143-E150, 1996.
- MCLELLAN, Tom M.; JACOBS, Ira. Reliability, reproducibility and validity of the individual anaerobic threshold. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, v. 67, n. 2, p. 125-131, 1993.
- MEZZANI, Alessandro et al. Upper intensity limit for prolonged aerobic exercise in chronic heart failure. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 42, n. 4, p. 633-639, 2010.
- MILLER, Benjamin F.; KONOPKA, Adam R.; HAMILTON, Karyn L. The rigorous study of exercise adaptations: why mRNA might not be enough. *Journal of Applied Physiology*, v. 121, n. 2, p. 594-596, 2016.
- MONOD, H.; SCHERER J. The work capacity of a synergic muscular group. *Ergonomics*, v.8, p.329-38, 1965.

- PAPOTI, M., SILVA, A.S., ARAUJO, G.G., SANTHIAGO, V., MARTINS, L.E., CUNHA, S.A., GOBATTO, C.A. Aerobic and anaerobic performances in tethered swimming. *Int J Sports Med*, v.34, p. 712-719, 2013.
- PEREZ DE HEREDIA, F., WOOD, I.S., TRAYHURN, P. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. *Eur J Physiol*, v.459, p. 509-518, 2010.
- POLISEL, E.E.C., SCARIOT, P.P.M., BECK, W.R., GOBATTO, C.A., MANCHADO-GOBATTO, F.B. Efeitos de onze semanas de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) e espaço habitacional sobre as capacidades aeróbia e anaeróbia de camundongos. In: *Anais VII Congresso de Ciência do Desporto e VI Simpósio Internacional de Ciência do Desporto*. Campinas: Unicamp, v. 1. p. 1-1, 2019.
- POOLE, DAVID C. et al. Metabolic and respiratory profile of the upper limit for prolonged exercise in man. *Ergonomics*, v. 31, n. 9, p. 1265-1279, 1988.
- PRINGLE, J.S.M., JONES, A.M. Maximal lactate steady state, critical power and EMG during cycling. *Eur J Appl Physiol*, v.88, p.214-26, 2001.
- ROCHA, S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci*, v. 32, p.389-397, 2007.
- SANDFORTH L, AMMAR N, DINGES LA, RÖCKEN C, ARLT A, SEBENS S, SCHÄFER H. Impact of the *Monocarboxylate Transporter-1* (MCT1)-Mediated Cellular Import of Lactate on Stemness Properties of Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells †. *Cancers (Basel)*. v.12, p.E581, 2020.
- SCARIOT, P.P.M., MANCHADO-GOBATTO, F.B., PROLLA, T.A., REIS, I.G.M., GOBATTO, C.A. . Housing conditions modulate spontaneous physical activity, feeding behavior, aerobic running capacity and adiposity in C57BL/6J mice. *Hormones and Behavior*, v. 115, p. 104556, 2019.
- SMITH, C.G., JONES, A.M. The relationship between critical velocity, maximal lactate steady-state velocity and lactate turnpoint velocity in runners. *J Appl Physiol*, v.85, p.19-26, 2001.
- STEGMANN, H.; KINDERMANN, W. Comparison of prolonged exercise tests at the individual anaerobic threshold and the fixed anaerobic threshold of 4 mmol· L⁻¹ lactate. *International journal of sports medicine*, v. 3, n. 02, p. 105-110, 1982.
- THOMAS, C., BISHOP, D.J., LAMBERT, K., MERCIER, J., AND BROOKS, G. A. (2012). Effects of acute and chronic exercise on sarcolemmal MCT1 and MCT4

contents in human skeletal muscles: current status. *AJP Regul Integr Comp Physiol*, v. 302, p. R1–R14, 2012.

ZAGATTO, A.M., PAPOTI, M., GOBATTO, C.A. Anaerobic capacity may not be determined by critical power model in elite table tennis players. *J Sports Sci Med*, v.7, p.54-8, 2008.