RAFAEL BARRERA SALGUEIRO

**EFEITO DA INFUSÃO DO LACTATO SOBRE A
ATIVIDADE DO EIXO GH-IGF-I EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

RAFAEL BARRERA SALGUEIRO

**EFEITO DA INFUSÃO DO LACTATO SOBRE A
ATIVIDADE DO EIXO GH-IGF-I EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof^ª Dr^a Maria Tereza Nunes

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Salgueiro, Rafael Barrera.

Efeito da infusão do lactato sobre a atividade do eixo GH-IGF-I em
ratos / Rafael Barrera Salgueiro. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de
concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Regulação
hormonal da expressão gênica.

Versão do título para o inglês: Effect of lactate infusion on the activity
of GH-IGF-I axis in rats.

1. mRNA 2. Eixo somatotrófico 3. Cronobiologia 4. Endocrinologia
5. Exercício físico 6. Metabolismo I. Nunes, Profa. Dra. Maria Tereza
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0142/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rafael Barrera Salgueiro.

Título da Dissertação: Efeito da infusão do lactato sobre a atividade do eixo GH-IGF-I em ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Tereza Nunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **137** nas fls. **110** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Tereza Nunes**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Efeito da infusão de lactato sobre a atividade do eixo GH/IGF-I em ratos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Rafael Barrera Salgado**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **20.09.2011**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 22 de setembro de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico a minha querida mãe Agueda, pelo carinho, incentivo e por estar sempre ao meu lado. Ao meu pai Richard, um homem sensato, a quem eu tenho como modelo. A minha irmã Julia, pela paciência e companheirismo. Vocês são meus maiores valores.

Dedico também à mulher da minha vida, minha namorada Lígia, pelo amor, amizade e apoio em todos os momentos. “*she woos me*”. Você tem todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Principalmente a minha orientadora, Maria Tereza Nunes, por ter me aceitado em seu laboratório, pela sua paciência com um jovem menino da EEFE e por ter investido muito em meu crescimento científico. Serei sempre grato por tudo.

A Leonice Poyares, nossa Lhôzinha, que muito me ensinou e me questionou, estimulando sempre o meu saber. Ela sempre acreditou em mim e eu continuo acreditando nela.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Aline, Ana K., Carlinhos, Carol, Croffi, Fran, Fred, Gí, Já, Letícia, Luquinhas, Marianinha, Nicole, Nina, Paula, Prévide, Sil, Thaís, Yogi. Por estarem ao meu lado quando foi preciso e dividir todos os meus momentos.

Aos colaboradores deste trabalho que tanto me ajudaram e se dispuseram para realização deste trabalho.

Aos professores Fábio Bessa Lima, José Donato Junior e William Tadeu Festuccia, pelas importantes contribuições no exame de qualificação.

A todos os funcionários do ICB-USP, por serem sempre tão solícitos e dedicados. Sou grato por tudo.

A CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

“(...) Faça como eu digo
Faça como eu faço
Aja duas vezes antes de pensar

Corro atrás do tempo
Vim de não sei onde
Devagar é que não se vai longe
Eu semeio o vento
Na minha cidade
Vou pra rua e bebo a tempestade.”

Chico Buarque de Holanda, Bom Conselho (1972).

RESUMO

SALGUEIRO, R. B. **Efeito da infusão do lactato sobre a atividade do eixo GH-IGF-I em ratos**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O lactato é um sal gerado a partir da redução do piruvato, metabólito proveniente do processo de metabolização da glicose, por meio de uma reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase. Além da sua ação oxidante intramuscular e sua utilização como substrato para a gliconeogênese no fígado, o lactato é um importante substrato energético para a manutenção da atividade das células em geral. Rotineiramente, sua concentração sanguínea é mensurada pelos fisiologistas esportivos como parâmetro de resposta ao incremento da intensidade do exercício físico, bem como para identificação de fadiga muscular. Sabe-se que as altas concentrações séricas de lactato desencadeiam diversas respostas fisiológicas, tais como melhora da atividade cognitiva, produção de fatores neurotróficos e estimulação da liberação dos hormônios hipofisários, como prolactina. Na condição de exercício, além do lactato, a concentração de GH na corrente sanguínea também se encontra elevada. Esse aumento vem sendo atribuído à queda da glicemia, bem como ao elevado grau de estresse causado pela atividade física intensa. No entanto uma avaliação da correlação entre a concentração de lactato sanguíneo e a síntese de GH nessa condição ainda não foi explorada. Isso se torna interessante, já que o aumento do lactato sanguíneo é um evento que, fisiologicamente, ocorre principalmente durante a atividade física. Esse estudo pretende investigar se o lactato gerado durante o esforço físico também poderia ser um fator que atua ativando o eixo somatotrófico. Para tal, ratos wistars (300 g), mantidos no biotério (ciclo 12 h/12 h), foram: (a) submetidos à injeção ip de lactato, na dose de 15 ou 150 μ mol, na fase clara ou escura do período de 24 h, sendo sacrificados após 30', 60' e 120' da injeção (**Estudo Agudo**) ou (b) anestesiados e, a seguir, submetidos à infusão ev (jugular) de lactato nas mesmas concentrações, na fase clara ou escura, num fluxo de 0.65 ml/h, por 180' e sacrificados a seguir (**Estudo crônico**). Foi coletado a hipófise e fígado dos ratos para avaliação da expressão gênica do GH (mRNA e proteína) e do mRNA de IGF-I. Os resultados foram analisados por ANOVA em 2-vias, seguido do Bonferroni como pós-teste e os valores foram considerados significativos para $p < 0,05$. O lactato injetado não alterou a lactacidemia nem a glicemia de nenhum grupo estudado. Contudo, após 30' da injeção de 15 e 150 μ mol de lactato no escuro, ocorreu aumento do mRNA do GH ($p < 0,01$), do conteúdo de GH sérico para os tempos de 30' e 120' ($p < 0,05$) e após 60' ocorreu aumento do mRNA IGF-I hepático ($p < 0,05$). O mRNA do GH dos animais tratados no claro não foi alterado. O conteúdo de mRNA de GH nos animais que receberam 15 μ mol de lactato no escuro (estudo crônico) se apresentou aumentado ($p < 0,001$), mas não houve alteração no conteúdo de GH hipofisário e no mRNA do IGF-I hepático. Os dados indicam que tanto a administração aguda quanto crônica de lactato no período de maior atividade dos animais aumenta a expressão do mRNA do GH/IGF-I, ou seja, lactato produzido no exercício físico pode ser um dos fatores que ativam o eixo somatotrófico nessa condição.

Palavras-chave: Metabolismo. mRNA. Endocrinologia. Cronobiologia. Exercício físico. Eixo somatotrófico.

ABSTRACT

SALGUEIRO, R. B. **Effect of lactate infusion on the activity of GH-IGF-I axis in rats.** 2013. 57 p. Masters thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The sodium lactate is produced at the end of cell's glucose metabolism process by the pyruvate reduction, process catalyzed by the lactate dehydrogenase enzyme. It behaves as an intramuscular oxidizing agent, an important substrate for liver gluconeogenesis and an energetic substrate for the maintenance of general cellular activity. Routinely, the blood concentration of this salt is measured by sport's physiologists as a parameter that indicates the physical exercise intensity and muscle fatigue. It is known that high blood lactate concentration increases brain derived neurotrophic factor production and prolactin secretion, and triggers other physiological responses, such as an improvement of cognitive activity. During physical exercise condition, beyond lactate, GH secretion is also elevated, which has been attributed to the glycemia decay, and by exercise-induced stress. However, a correlation between blood lactate concentration and GH secretion in this condition was not explored yet. This study attempted to investigate this possibility, by evaluating the effects of sodium lactate at 15 and 150 μ mol concentrations administration (iv or ip) on somatotrophic axis activity in rats. The experiments were performed at the beginning of the light or dark period of the light-dark cycle. During the study, blood samples were taken for measurement of blood lactate and glucose and after sacrifice. Collect the pituitary and liver of rats for GH gene expression (mRNA and protein) and IGF-I mRNA. The results were analyzed by 2-way ANOVA followed by Bonferroni post-test and how the values were considered significant at $p < 0.05$. The lactate injected did not alter lactate or glucose in any group studied. However, after 30' the injection of 15 and 150 μ mol lactate in the dark mRNA was increased GH ($p < 0.01$), serum GH content for times of 30' and 120' ($p < 0.05$) and after 60' mRNA was increased hepatic IGF-I ($p < 0.05$). The increase of GH mRNA observed 30' in the course of the treated animals was not significant. The content of GH mRNA in animals given 15 μ mol lactate in the dark (chronic study) were rise ($p < 0.001$), but there was no change in the content of pituitary's GH mRNA and liver's IGF-I mRNA. The data indicate that both acute and chronic administration of lactate in the period of greatest activity of animals increases the mRNA expression of GH. The increase in IGF-I mRNA liver observed in animals that were treated acutely with lactate period of its activity suggests that GH secretion is increased. In short, lactate produced in the exercise may be one of the factors that activate the somatotrophic axis in this condition.

Keywords: mRNA. Somatotrophic axis. Chronobiology. Endocrinology. Physical exercise. Metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lactacidemia de animais tratados com lactato a 15 e 150 μ mol em diferentes tempos de sacrifício na fase clara.....	29
Figura 2 - Glicemia de animais tratados com lactato a 15 e 150 μ mol em diferentes tempos de sacrifício na fase clara.....	30
Figura 3 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de GH de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase clara.....	31
Figura 4 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de GH no soro de ratos tratados agudamente com 15 μ mol de lactato, na fase clara.....	31
Figura 5 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de IGF-I Hepático de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase clara.....	32
Figura 6 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de ERK1 hepática de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase clara.....	33
Figura 7 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de SOCS3 hepática de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase clara.....	33
Figura 8 - Lactacidemia de animais tratados com 15 e 150 μ mol de lactato em diferentes tempos de sacrifício e doses de lactato, na fase escura.....	34
Figura 9 - Glicemia de animais tratados com 15 e 150 μ mol de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura.....	35
Figura 10 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de GH de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase escura.....	36
Figura 11 - Efeito da injeção de lactato sobre a concentração de GH no soro de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase escura.....	37
Figura 12 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de IGF-I hepático de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase escura.....	38
Figura 13 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de pJNK hepática de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase escura.....	38
Figura 14 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de pJAK2 hepática de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase escura.....	39
Figura 15 - Efeito da infusão de lactato sobre conteúdo de ERK1 hepática de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase escura.....	39
Figura 16 - Efeito da infusão de lactato sobre conteúdo de SOCS3 hepática de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato, na fase escura.....	40
Figura 17 - Lactacidemia dos tempos 60', 120' e 180' de animais tratados cronicamente com 15 e 150 μ mol de lactato, nas fases clara e escura.....	41

Figura 18 - Glicemia nos tempos 60', 120' e 180' de animais tratados cronicamente com 15 e 150 μ mol lactato, nas fases clara e escura.....	41
Figura 19 - Efeito da infusão de lactato sobre a expressão gênica de GH de ratos tratados cronicamente com 15 e 150 μ mol de lactato, nas fases clara e escura.....	42
Figura 20 - Efeito da infusão de lactato sobre conteúdo proteico de GH hipofisário de ratos tratados cronicamente com 15 e 150 μ mol de lactato, nas fases clara e escura.....	43
Figura 21 - Efeito da infusão de lactato sobre conteúdo sérico de GH de ratos tratados cronicamente com 15 e 150 μ mol de lactato, nas fases clara e escura.....	44
Figura 22 - Efeito da infusão de lactato sobre a expressão gênica de IGF-I hepático de ratos tratados cronicamente com 15 e 150 μ mol de lactato, nas fases clara e escura.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 LACTATO E ATIVIDADE FÍSICA	16
1.2 LACTATO COMO SUBSTRATO ENERGÉTICO	19
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 ESTUDO AGUDO/ INJEÇÃO AGUDA	23
4.2 ESTUDO CRÔNICO/ INFUSÃO CONTÍNUA	23
5 PROCEDIMENTOS	25
5.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GH	25
5.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MRNA DO GH NA HIPÓFISE E DO IGF-I HEPÁTICO POR PCR EM TEMPO REAL	25
5.3 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DO GH HIPOFISÁRIO	26
5.4 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DO GH NO FÍGADO	27
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
7 RESULTADOS	29
7.1 AGUDO/ CLARO	29
7.1.1 Efeito da administração de lactato (15 e 150 μ mols) ao longo do tempo sobre a lactacidemia e glicemia de ratos	29
7.1.2 Efeito da administração de 15 e 150 μ mols de lactato sobre o eixo somatotrófico	30
7.1.2.1 Expressão gênica de GH e sua concentração sérica	30
7.1.2.2 Expressão hepática do mRNA de IGF-I e das proteínas da ERK1 e SOCS	32
7.2 AGUDO/ ESCURO	34
7.2.1 Efeito da administração de lactato (15 e 150 μ mols) ao longo do tempo sobre a lactacidemia e glicemia de ratos	34
7.2.2 Efeito da administração de 15 e 150 μ mols de lactato sobre o eixo somatotrófico	35
7.2.2.1 Expressão gênica e concentração sérica do GH	35

7.2.2.2 Expressão hepática do mRNA de IGF-I e das proteínas pJNK, pJAK2, ERK1 e SOCS3.....	37
7.3 ESTUDO CRÔNICO/ INFUSÃO CONTÍNUA.....	40
7.3.1 Efeito da administração de 15 e 150 μ mol de lactato por 180 minutos ao longo do tempo sobre a lactacidemia e glicemia de ratos.....	40
7.3.2 Efeito da administração de 15 e 150 μ mol de lactato por 180 minutos sobre o eixo somatotrófico.....	42
7.3.2.1 Expressão gênica e proteica hipofisária e concentração sérica do GH.....	42
8 DISCUSSÃO.....	46
9 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O GH é um hormônio com mais de 100 isoformas existentes, sendo a de 22 kDa a mais conhecida dessa numerosa família. Sintetizado e secretado por células somatotróficas da adenohipófise de mamíferos, tem sua liberação inibida pela somatostatina (SS), esta produzida principalmente por neurônios dos núcleos periventriculares hipotalâmicos, e estimulada por hormônio liberador de GH (GHRH), cuja síntese ocorre em neurônios dos núcleos arqueados (FODOR et al., 1994). A atividade desses núcleos é regulada por retroalimentação negativa do próprio GH, Fator do Crescimento semelhante à Insulina-I (IGF-I) (BERMANN et al., 1994), bem como por alguns fatores de estresse e perturbação da homeostase.

O GHRH é liberado no sistema porta-hipotálamo-hipofisário, sendo reconhecido por receptores de membrana (GHRH-r) acoplados à proteína G estimulatória (Gs), expressos no somatotrofo. Dessa interação ocorre ativação da via adenilato ciclase-AMPC-proteína quinase A (PKA), com consequente externalização de vesículas contendo GH e concomitante a ativação da via de síntese de GH. Já, a inibição da liberação de GH por SS ocorre através da ativação de receptores (SSTR) acoplados a proteína G inibitória (Gi) que, por inibição da PKA, leva à redução do conteúdo intracelular de AMPC evitando a despolarização do somatotrofo e, consequentemente, a secreção do hormônio (ROOT; ROOT, 2002).

O estudo de Kamegai et al. (1998), em ratos espontaneamente anões (SDR), demonstrou que a deficiência de GH promove aumento da expressão do GHRH e de seus receptores GHRH-r, bem como redução da síntese de neuropeptídio Y (NPY) e SS, e que sua reposição exógena, promove efeito inverso, demonstrando a importância do GH no controle da atividade de seu eixo.

Participam também da regulação da expressão gênica de GH o hormônio tireoidiano, que promove o seu aumento (CHOMCZYNSKI; SOSZYNSKI; FROHMAN, 1993); as catecolaminas, que por vias alfa-adrenérgicas elevam a secreção de GHRH, ativando o eixo somatotrófico (DELITALA et al., 1987; DÍAZ-TORGA et al., 2002) e fatores metabólicos, como a redução da glicemia e dos lipídeos plasmáticos, que também elevam a secreção de GH (SHIBASAKI et al., 1985). Recentemente foi descoberto um outro hormônio, a Grelina, que exerce um potente efeito estimulatório sobre a secreção de GH atuando diretamente no somatotrofo, via receptor acoplado a proteína Gq, bem como em neurônios secretores de GHRH (KOJIMA et al., 1999).

Uma vez secretado, o GH interage com receptores específicos localizados em diversos tecidos. No fígado, o GH atua estimulando a síntese e secreção de IGF-I, que é o principal mediador dos efeitos do GH sobre o crescimento e desenvolvimento (CLEMMONS; VAN WYK, 1984). Por sua vez, o IGF-I sanguíneo também atua na glândula hipofisária suprimindo a secreção de GH, bem como no hipotálamo, regulando negativamente a atividade do eixo somatotrófico.

A maior parte do IGF-I circulante encontra-se acoplada às proteínas ligantes presentes no plasma (IGFBP). Essas proteínas são importantes para a regulação da meia-vida e da concentração de IGF-I livre plasmático.

O IGF-I tem papel essencial na proliferação e diferenciação de condrócitos, atuando diretamente nas placas epifisárias, induzindo mitogênese e crescimento longitudinal dos ossos. O GH também promove aumento da síntese de IGF-I na placa epifisária, onde o IGF-I atua parácrina/autocrinamente promovendo os efeitos descritos acima. O IGF-I atua também induzindo hipertrofia das células musculares pelo aumento da síntese proteica local por ativação da via PI3-K/AKT/mTOR.

O IGF-I apresenta alta atividade metabólica, promovendo importantes efeitos no metabolismo dos carboidratos. Ao contrário do GH, que é um potente antagonista da insulina, o IGF-I atua aumentando a sensibilidade à insulina nos tecidos, participando assim do controle da homeostase glicêmica, efeito que também decorre da sua ação inibitória sobre a síntese e secreção de GH (CLEMMONS, 2006; SAUKKONEN et al., 2004).

O GH e suas isoformas moleculares também promovem ações fisiológicas *per se* nos mamíferos. Sabe-se que eles participam da estimulação da gliconeogênese hepática e da lipólise no tecido adiposo branco (VANCE; HARTMAN; THORNER, 1992). Além disso, aumentam o transporte de aminoácidos através da membrana plasmática, bem como a transcrição gênica, o que leva a maior taxa de síntese protéica.

Sabe-se que cada variante desse hormônio é induzida por estimulação independente, o que exige metodologias específicas de reconhecimento. Estudos desenvolvidos por Ellis, Vodian e Grindeland (1978) levaram à identificação de uma proteína plasmática de peso molecular entre 60 a 80 kDa, diferente, portanto, do peso molecular do GH de 22kDa, que não era detectável por radioimunoensaio, mas que, por meio de ensaio biológico, promovia crescimento epifisário da tíbia de ratos. Essa molécula foi denominada de bGH, por possuir atividade de GH detectada apenas por ensaio biológico. Contudo, os mecanismos que regulam a secreção de bGH ainda não foram identificados.

Uma proposta para essa regulação foi elaborada por Gosselink et al. (2000), que demonstraram que a estimulação do nervo na musculatura esquelética de contração lenta de ratos aumenta a razão do GH plasmático/hipofisário medido por ensaio biológico (bGH), parâmetro que não foi alterado quando a medida foi efetuada por radioimunoensaio (iGH), sugerindo que sinais gerados na musculatura teriam participação na liberação de bGH.

Outras investigações que correlacionaram a resposta da síntese/secreção de GH com atividade física corroboram os achados de Gosselink et al. (2000), embora as suas causas ainda não tenham sido definidas. Este campo se encontra incerto, pois cada protocolo experimental utiliza-se de diferentes ensaios para mensurar a concentração sérica do GH (WIDEMAN et al., 2002); no entanto, os resultados mais expressivos mostram que a magnitude da liberação do GH está correlacionada com o incremento da intensidade da atividade física.

Nesse sentido, Wideman et al. (1999), mostrou que 30 minutos de exercício aeróbio de alta intensidade foi eficiente para elevar a concentração sérica de GH a seu máximo em homens e mulheres adultos, atribuindo para tal resposta a combinação do aumento na secreção de GHRH com a supressão da secreção de SS.

Alguns estudos relacionaram, também, a acidose metabólica produzida na atividade física com a indução de expressão do GH humano (hGH) (MATSUSE et al., 2010; GODFREY; MADGWICK; WHYTE, 2003). O estudo de Takarada et al. (2000) mostrou que o exercício resistido de extensão do membro inferior (20% de 1 Repetição Máxima – 1RM) combinado ou não com oclusão vascular do membro promove um aumento da concentração plasmática de GH em ~290 vezes e ~100 vezes, e da concentração de lactato de 4 e 2 vezes, respectivamente. Takarada propôs que a acidose local gerada promoveria estimulação da atividade do nervo simpático levando à secreção de GH.

1.1 LACTATO E ATIVIDADE FÍSICA

O lactato é um ânion gerado a partir da redução do piruvato, metabólito proveniente do processo de metabolização da glicose, por meio de uma reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH), a qual é responsável pela oxidação do NADH e consumo de um íon H^+ , acumulados durante toda a metabolização anaeróbica, em NAD^+ .

Suas condições de produção no organismo humano são bem conhecidas, sendo que em alta atividade metabólica, hipoglicemia e em estado de hipóxia, suas concentrações sanguíneas alcançam níveis elevados (GLADDEN, 2004). Contudo suas ações metabólicas e

endócrinas não foram devidamente elucidadas, sendo as respostas ao acúmulo de lactato um tema relevante para futuras pesquisas.

Em condições de exercício físico intenso a demanda energética é grande, o que faz com que a razão ADP/ATP se eleve no músculo em atividade, bem como em todos os tecidos. Para suprir essa demanda ocorre um importante aumento da metabolização da glicose, pelo mecanismo anaeróbio. O tecido mais afetado por esse desbalanço é a musculatura sobrecarregada pelo esforço, que é capaz de aumentar as suas necessidades energéticas em até 50 vezes, o que eleva a sua produção de lactato. Assim, na condição de exercício a 75% do $\text{VO}_{2\text{max}}$ as concentrações séricas de lactato podem ultrapassar o valor de 6 mM (VAN HALL et al., 2009).

Isto porque, na falta de oxigênio muscular, o mecanismo de fosforilação oxidativa do ATP, situado na membrana interna da mitocôndria, se encontra desacelerado, o que futuramente, promoverá a inibição alostérica da piruvato desidrogenase. A inibição desta enzima acarreta em um acúmulo de piruvato e íons de H^+ no citosol, já que a mesma é crucial para a entrada de piruvato na mitocôndria. O aumento desses substratos no citossol e a diminuição do pH citoplasmático serão fundamentais para deslocar a reação no sentido da síntese de lactato. O aumento da concentração intracelular do lactato resulta no seu efluxo para a corrente sanguínea via transportadores transmembrânicos de monocarboxilato ($\text{MCT}_{1/4}$) (ZAJAC; WĄSKIEWICZ; PILIS, 2001).

Esse processo requer o cotransporte do íon H^+ na proporção 1:1 e é considerado o mecanismo que mais contribui para a acidose metabólica do organismo. Contudo, esse transporte é essencial para os músculos na manutenção do seu pH durante a atividade física, já que aproximadamente 50% dos íons H^+ circulantes provem desse mecanismo (PILEGAARD et al., 1999).

Estudos em humanos demonstraram que estímulos crônicos de treinamento por 7 dias resultam no aumento de 30-100% da capacidade do transportador lactato/ H^+ (MCT) mensurado em vesículas de sarcolema. Nessa situação ocorre também o aumento da densidade do seu transportador na membrana de músculos esqueléticos vermelhos e, instantaneamente, da sua velocidade máxima de transporte. Adicionalmente, foi identificado que o aumento de MCT_1 está intrinsecamente relacionado ao estado de treinamento dos indivíduos, sendo que os mais treinados possuem maior conteúdo de MCT_1 na musculatura do vasto lateral e o destreinamento diminui o seu conteúdo proteico (MCCULLAGH; BONEN, 1995; THOMAS et al., 2005; WILSON et al., 1998).

Garcia et al. (1995), mostraram que o K_m dos $MCT_{1/4}$, encontrados em músculos esqueléticos e cardíaco de humanos, é de aproximadamente 8,5 mM de lactato e que o efluxo de lactato é maior que seu influxo (BONEN, 2001). Contudo, estudo de McCullagh et al. (1996), mostrou uma curiosa correlação ($r=0,91$) entre a maior quantidade de MCT_1 nos músculos de predominância de fibras oxidativas do que o conteúdo de MCT_1 em musculatura predominantemente glicolítica, mostrando que a fibra I tem provável função de captar o lactato liberado na circulação por outros tecidos, já que possui maior capacidade de metabolizá-lo e menor de produzi-lo.

Devido ao fato do transporte de lactato estar acoplado a íons de hidrogênio, por muito tempo esse sal foi considerado o causador e/ou sinalizador da fadiga muscular, e rotineiramente vêm sendo mensurado na circulação sanguínea para avaliar o grau de intensidade dos treinamentos. A elevação da concentração de lactato sanguíneo acima do segundo limiar anaeróbico é um indício de que o organismo do indivíduo não está sendo capaz de remover o excesso de íons H^+ da circulação, o que desencadeia importantes alterações funcionais, incluindo déficits na função motora (MARKOWITZ e ARENT, 2010; SAHLIN et al., 1976).

Fregosi e Dempsey (1984), descreveram a regulação do equilíbrio ácido-base e alguns parâmetros metabólicos em resposta a diferentes intensidades de exercício físico em ratos (Tabela I). Os níveis de pH e de HCO_3^- dos animais sofreram diminuição significativa a 7,31 e 14,4 mM, respectivamente, e a concentração de lactato sanguíneo aumentou proporcionalmente à intensidade do exercício, atingindo 9,15 mM no exercício exaustivo.

Tabela 1 – Valores de lactacidemia em relação à quantidade de esforço físico.

	$\dot{V}O_2$ ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	$\dot{V}CO_2$ ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹	$\dot{V}A$ ml/min	T_m °C	P_{aCO_2} Torr	$P_{A_{O_2}}$ Torr	P_{aO_2} Torr	pH	$[HCO_3^-]_a$ mM	$[LA^-]_a$ mM
Rest (n = 26-34)	21.0±0.60	16.2±0.57	106±4	38.4±0.1	39.4±0.5	94±0.95	89±0.8	7.44±0.005	26.5±0.35	0.71±0.05
Mild exercise (n = 21-25)	48.7±0.85†	40.2±1.00†	305±11†	38.9±0.1†	34.3±0.8†	103±1.20†	94±1.9†	7.47±0.008†	25.0±0.65†	1.62±0.20†
Moderate exercise (n = 19)	55.0±1.40†‡	51.0±1.20†‡	452±19†‡	39.0±0.1†	30.0±0.9†‡	110±1.00†‡	93±2.0	7.43±0.013‡	20.3±1.20†‡	4.30±0.44†‡
Heavy exercise (n = 11)	65.0±1.50†‡	64.0±1.90†‡	537±25†‡	39.3±0.2†	29.9±1.3†	111±1.50†	97±2.9†	7.39±0.020†	18.2±1.20†	7.14±0.65†‡
Maximum exercise (n = 15)*	72.0±1.50†‡	74.0±1.90†‡	674±46†‡	39.7±0.2†	28.5±1.4†	116±2.00†	104±1.4†	7.31±0.020†‡	14.4±1.20†‡	9.15±0.82†‡

Values are means ± SE. During all exercise, treadmill speed (m·min⁻¹)/grade (%) averaged, 16/0, 21/0, or 10 and 28/10 for mild, moderate, and heavy exercise, respectively. Exercise duration was 10 min with measurements taken during last minute. Maximum represents final work load of a progressive maximum test where speed/grade were increased every 90 s (see METHODS). $\dot{V}O_2$, O₂ consumption; $\dot{V}CO_2$, CO₂ production; $\dot{V}A$, alveolar minute ventilation; T_m , rectal temperature; P_{aCO_2} , arterial PCO₂; $P_{A_{O_2}}$, alveolar PO₂; P_{aO_2} , arterial PO₂; LA, lactate. * n = 15 for all variables except $P_{A_{O_2}}$ and P_{aO_2} where n = 10. † Significantly different from rest ($P \leq 0.05$). ‡ Significantly different from next lowest exercise level ($P \leq 0.05$).

Fonte: Tabela retirada do artigo de Fregosi e Dempsey (1984), contendo valores metabólicos e respiratórios do estado de repouso e em reposta ao incremento do exercício físico em ratos não treinados.

Estudos de Thomas et al. (2005), realizados em humanos submetidos à corrida de longa distância mostraram que o pico de lactato sanguíneo de indivíduos sedentários/destreinados foi de 13.4 mM e que o mesmo protocolo de esforço físico aplicado a corredores treinados a média distância e corredores treinados a longa distância resultou em um pico de lactato de 13.8 mM e de 9.7 mM, respectivamente. Ainda neste estudo, Thomas discute a maior capacidade dos sujeitos treinados na remoção do lactato e íons H^+ da corrente sanguínea e que essa remoção é essencial para manutenção da produção de força pela musculatura esquelética, corroborando os estudos de McCullagh et al. (1996).

Evidências apontaram também que o lactato é um inibidor da ATPase miofibrilar e da SERCA (Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático) (FAVERO et al., 1995; FITTS; HOLLOSZY, 1976). No entanto, estudo de Nielsen, Paoli, e de Overgaard (2001), mostrou que em condições de elevada concentração de K^+ no LEC, situação que mimetiza um exercício físico intenso, a “acidose láctica” promoveu ações protetoras ao músculo sóleus *in vitro* isolado de rato, o que contrasta com a atribuição aceita do papel da acidose como causa da fadiga muscular.

1.2 LACTATO COMO SUBSTRATO ENERGÉTICO

Cerca de $\frac{1}{4}$ da glicose sanguínea é utilizada pelo sistema nervoso central (SNC), como principal fonte energética. Porém esse substrato não é a única fonte de carbono para o metabolismo cerebral. Após a glicose ser catabolizada pelas células gliais, que constituem cerca de 90% das células neurais, ocorre à produção de lactato que é transferido para os neurônios via Lançadeira de Lactato do Astrócito para o Neurônio (ANLS) (MAGISTRETTI; PELLERIN, 1999). Cerca de 7% do lactato sanguíneo é utilizado como fonte de energia pelo SNC e 20% pelos músculos, podendo alcançar patamares acima de 25% de consumo em situações de atividade física (VAN HALL et al., 2009).

A hipótese ANLS consiste no efluxo de lactato via MCT_1 dos astrócitos para seu influxo por MCT_2 nos neurônios, que metabolizam cerca de 8% de lactato em suas mitocôndrias, poupando a oxidação de glicose. Há também uma possível via direta do lactato sanguíneo para a utilização energética dos astrócitos e neurônios. Porém, ainda não se sabe ao

certo a capacidade limite do SNC na extração de lactato da corrente sanguínea e se ocorre um possível acúmulo deste metabólito em determinadas situações.

Há evidências de que com o aumento do lactacidemia, o lactato seja convertido a piruvato, pela ação da LDH, não só no fígado, mas também em tecidos com elevada concentração de mitocôndrias, como coração e músculo esquelético oxidativo, nos quais foram detectados MCTs na membrana da mitocôndria e LDHs no seu interior, proteínas que permitirão a entrada de lactato e sua metabolização direta na mitocôndria para a formação de ATP (LING et al., 2012).

Estudos recentes mostram que a metabolização do lactato em mitocôndrias de células nervosas é capaz de produzir 17 moléculas de ATP, provendo uma rica fonte de energia para seu próprio consumo. Além disso, o aumento da lactacidemia na microcirculação do SNC provocado pelo aumento da glicólise promove uma vasodilatação local, redirecionando o sangue contendo oxigênio e substratos para essas regiões com alto grau de atividade (GORDON et al., 2008).

Estudo de Parsons e Hirasawa (2010), mostrou que o bloqueio dos MCTs com ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico, em neurônios orexígenos depletados de glicose, provoca o desaparecimento total da sua frequência de disparos, e que sua atividade de disparos retorna ao basal no momento em que houve o desbloqueio desses transportadores por aumento da concentração de lactato de sódio no meio de cultura.

Pesquisas em humanos revelaram que durante o treinamento exaustivo em esteira (KRAEMER; RATAMESS, 2005; ROJAS VEGA et al., 2006) e com a infusão de lactato (SCHIFFER et al., 2011) ocorre um aumento na produção de *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), o que poderia estar associado aos efeitos benéficos da atividade física sobre a cognição e plasticidade neuronal. Além disso, há resultados que mostram a liberação de alguns hormônios, como prolactina e fatores de crescimento, pelas alterações do equilíbrio ácido-base durante o esforço físico em exaustão (DE MEIRLEIR et al., 1985; ROJAS VEJA; STRÜDER; HOLLMANN, 2003; ROJAS VEGA et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o exercício físico promove aumento da liberação do GH. Diversos fatores são apontados como mediadores dessa indução, entre eles, a rápida queda da glicemia, em resposta a inserção de GLUT₄ na membrana plasmática induzida pela contração muscular, o que leva à redução da SS, e o estresse, que é uma via importante de estímulo para a liberação de GHRH. No entanto, é possível que haja fatores específicos do exercício que participem dessa resposta.

Considerando que durante o exercício físico ocorre aumento do lactato sanguíneo proporcional à sua intensidade, torna-se interessante investigar se esse fator não poderia também estar relacionado com o aumento da liberação de GH e/ou atividade do eixo somatotrófico detectada nessa condição fisiológica.

3 OBJETIVO

O presente trabalho pretende, por meio da injeção de duas concentrações de lactato, mimetizar diferentes graus de intensidade de atividade física, para avaliar se há correlação entre a síntese e secreção de GH induzidas por essa condição experimental. Também avaliou-se a resposta do eixo somatotrófico à elevação súbita (injeção única) ou mantida (infusão contínua) do lactato sanguíneo, com a finalidade de simular uma sessão de atividade física de curta e longa duração, respectivamente.

Para tal pretendeu-se avaliar a expressão do mRNA e da proteína GH na hipófise, a sua concentração sérica por ELISA e a atividade biológica do hormônio, por meio da avaliação do conteúdo do mRNA do IGF-I hepático. Buscou-se também avaliar o conteúdo de algumas proteínas envolvidas na via de sinalização do GH no fígado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 112 ratos da linhagem Wistar (~300 g) provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Uma parcela desses foi mantida sob condições padronizadas de temperatura ambiental (25 ± 1 °C) em ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias: iniciando-se o claro às 06 h), e outra parte foi mantida em ciclo invertido (luzes acendem às 18 h). A água e alimentação foram fornecidas *ad libitum*, até 3 horas antes do experimento. No início do experimento foi coletada uma pequena amostra de sangue da veia caudal para mensurar a glicemia e lactacidemia basal.

Foram realizados dois tipos de estudo: (a) um em que os animais receberam uma única injeção de lactato em duas doses diferentes, e foram sacrificados após diferentes tempos da injeção (**ESTUDO AGUDO/ INJEÇÃO ÚNICA**). Neste estudo parte dos animais foi sacrificada na fase **clara** do dia e parte na **escura**, para avaliar possíveis influências do grau de atividade dos mesmos nos parâmetros analisados, já que os roedores são animais de hábito noturno e (b) outro em que o lactato foi infundido, também em duas doses diferentes, por um período de 3 horas, após o qual os animais foram sacrificados para a avaliação dos parâmetros propostos (**ESTUDO CRÔNICO/ INFUSÃO CONTÍNUA**).

4.1 ESTUDO AGUDO/ INJEÇÃO AGUDA

Neste estudo, grupos de animais foram submetidos a uma única injeção ip de lactato de sódio 30 ou 300 mM (Sigma) num volume de 0,5 ml, no início da fase clara ou escura, o que equivale à administração de 15 ou 150 μ mol de lactato, respectivamente, ou salina (0,9%), constituindo assim os grupos 15 μ mol, 150 μ mol de lactato e controle, respectivamente. Após 30', 60' e 120' do tratamento, amostras de sangue de todos os grupos de animais foram coletadas (veia caudal) para dosagem de lactato e glicose, seguindo-se o sacrifício dos mesmos por decapitação.

4.2 ESTUDO CRÔNICO/ INFUSÃO CONTÍNUA

No dia do experimento os ratos foram anestesiados ip com uma solução em volume adequado para fornecer 9 mg/kg cetamina, 182 mg/kg de cloridrato de zolazepam e 1 mg/kg de acepromazina. Após anestesia, os animais foram submetidos ao protocolo experimental que se constituiu na infusão total de 15 μ mol, 150 μ mol de lactato de sódio (Sigma-Aldrich)

ou salina (controle) na veia jugular esquerda, por uma bomba de infusão PHD 2000 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), num fluxo de 0.65 ml/h, por três horas (HOLLOWAY et al., 2007). Durante a infusão e, imediatamente antes dela (amostra basal), foram coletadas amostras de sangue da veia caudal nos tempos zero, 60', 120' e 180' para dosagem do lactato e glicose. Todos os animais foram sacrificados simultaneamente.

5 PROCEDIMENTOS

5.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GH

Após o sacrifício dos animais, o sangue foi coletado do tronco, centrifugado, sendo o soro armazenado em tubos eppendorf à -80 °C, para determinação da concentração de GH por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) (HASHIMOTO et al., 1998).

O lactato sanguíneo foi determinado por meio do aparelho Accutrend Plus (Roche), utilizando-se fitas reagentes específicas (Accusport BM - Lactate). A glicemia foi determinada utilizando-se o aparelho Optium Xceed (Abbott) por meio de fitas específicas para tal.

5.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO mRNA DO GH NA HIPÓFISE E DO IGF-I HEPÁTICO POR PCR EM TEMPO REAL

As hipófises e parte do fígado foram removidas, homogeneizadas e submetidas à extração do RNA total utilizando-se o método trizol (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 2006). Foi feita uma averiguação da integridade do RNA total por meio de eletroforese em gel de acrilamida 1%, evidenciando as bandas de RNAs ribossomais 28S e 18S.

Um micrograma de RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA por meio de transcrição reversa (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). A amplificação do produto da transcrição reversa foi realizada usando o kit de SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Warrington, UK) e primers específicos (Tabela 2) para GH, IGF-I e RPL19 (controle interno). A análise baseada no PCR em tempo real foi realizada com o aparelho Rotor Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 2 – Lista de Primers.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS
GH Sense	5'-GAGTTCGAGCGTGCCTACATTC-3'
GH Antisense (reverse)	5'-GCAGGAGAGCAGCCCATAGTTT-3'
RPL19 Sense	5'-CCAATGAAACCAACGAAATCG-3'
RPL19 Antisense (reverse)	5'-TCAGGCCATCTTTGATCAGCTT-3'
IGF-I Sense	5'-AAGCCTACAAAGTCAGCTCG-3'
IGF-I Antisense (reverse)	5'-GGTCTTGTTTCCTGCACTTC-3'

Sequência dos *Primers* utilizados no PCR em tempo real.

5.3 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DO GH HIPOFISÁRIO

A hipófise foi removida, homogeneizada em solução tampão (20 mM Tris HCl, 0,25 M sacarose e 2 mM MgCl₂) e, após centrifugação à 10.000 g por 40 minutos, a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Dye Reagent Concentrate). As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, seguindo-se a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose por eletrotransferência (35 mV) por 15 h a 4 °C. A membrana foi bloqueada com solução de lavagem mais 30 g BSA e 0,2 g Azida de Sódio por 1 h, à temperatura ambiente (TA) e incubada com o anticorpo primário (anti-GH; 1:5000) diluído em PBS-TWEEN e 5% de BSA, por 15 h à 4 °C. Após a remoção do excesso de anticorpo primário por lavagens em solução contendo 1000 ml buffer A (0,05 M Tris-HCl no pH 7,5 e 1,5 M NaCl) mais 0,5 ml de TWEEN-20 e 0,5 ml de NP-40) a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico (anti-rabbit; 1:5000), por 2 h à TA, diluído em PBS-TWEEN e 5 % de BSA. Após esse período, a membrana foi novamente lavada com a solução de lavagem, iniciou-se a reação para detecção das bandas utilizando-se o kit de ECL.

5.4 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DAS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DO GH NO FÍGADO

O fígado foi removido e homogeneizado em tampão específico (9 ml de solução 1,5 M de NaCl, 1,35 ml de solução 200 mM de KCl, 500 µl de solução 200 mM de MgCl₂, 200 µl de solução 500 mM de EDTA no pH 8,0, 5 ml de solução 100 mM de Pirofosfato de Sódio, 2 ml de solução 0,5 M de NaF, 5 ml de solução TritonX-100 a 20%, 13,4 ml de Glicerol a 75%, 2 ml de solução 1 M de Tris no pH 7,8 e qsp 100 ml), seguindo-se o procedimento similar ao descrito no item anterior (determinação de proteínas totais, eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) e eletrotransferência das proteínas a uma membrana de nitrocelulose). A membrana foi incubada com os anticorpos primários, diluídos em PBS-TWEEN e 5% de BSA, nas concentrações especificadas na tabela 3. Seguiu-se a incubação com os anticorpos secundários específicos listados na mesma tabela referida. A reação foi detectada por de ECL, conforme descrito no item anterior.

Tabela 3 - Lista anticorpos.

Anticorpos Primários	Fabricante	Anticorpos Secundários
ERK 1 (1:3000)	Santa Cruz	Anti-rabbit (1:5000)
ERK 2 (1:3000)	Santa Cruz	Anti-rabbit (1:5000)
SOCs 3 (1:5000)	Abcam	Anti-rabbit (1:5000)
pJNK (1:5000)	Cell signaling	Anti-rabbit (1:5000)
pJAK 2 (1:1000)	Santa Cruz	Anti-rabbit (1:5000)
GH (1:1000)	National Hormone and Pituitary Program	Anti-rabbit (1:5000)

Lista de anticorpos primários e secundários, e suas concentrações, utilizados no Western Blotting.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados por Análise de Variância de duas vias (2 way ANOVA), seguindo-se a análise de Bonferroni como pós-teste. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 AGUDO/ CLARO

Todo experimento intitulado Agudo/ Claro ocorreu no início da fase clara do dia, momento em que se estabelece a menor atividade metabólica dos animais. Os animais que receberam salina não apresentaram alteração significativa na expressão do mRNA de GH e do IGF-I, bem como na quantidade de proteínas avaliadas nos tempo estudados.

7.1.1 Efeito da administração de lactato ao longo do tempo sobre a lactacidemia e glicemia de ratos

Nota-se que durante todo o experimento não ocorreu variação da concentração de lactato sanguíneo (Figura 1) nem da glicemia (Figura 2) nos animais tratados com lactato e avaliados nos diferentes tempos após a injeção.

Figura 1- Efeito da injeção de lactato sobre a lactacidemia.

Avaliação da lactacidemia de animais tratados com 15 e 150 µmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase clara. N= 4 por grupo.

Figura 2 - Efeito da injeção de lactato sobre a glicemia.

Avaliação da glicemia de animais tratados com 15 e 150 µmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase clara. N=4 por grupo.

7.1.2 Efeito da administração de lactato sobre o eixo somatotrófico.

7.1.2.1 Expressão gênica de GH e sua concentração sérica

A figura 3 ilustra a expressão do mRNA de GH após 30', 60' e 120' da injeção única de 15 e 150 µmols de lactato.

Observa-se que o conteúdo de mRNA de GH não se alterou significativamente em 30' e 60' após a injeção de lactato nas duas concentrações vs o grupo que recebeu salina. No entanto, observa-se aos 120 minutos de tratamento um aumento da expressão gênica do GH, ainda que não significativo, principalmente com a menor dose de lactato.

Figura 3 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de GH.

Avaliação do conteúdo do mRNA do GH normalizado pela expressão gênica da constitutiva ribossomal RPL19, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 µmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase clara. N=4 por grupo.

A figura 4 mostra os resultados da variação sérica de GH após 30' e 60' da injeção de 15 e 150 µmols de lactato comparados com os seus respectivos controles. Observamos uma diminuição do percentual de GH sérico para as duas doses, após 30' da injeção, seguido por um retorno a condições semelhantes a do controle após 60', contudo os dados não apresentaram valor de significância estatística.

Figura 4 - Efeito da injeção de lactato sobre a variação sérica de GH.

Avaliação da variação sérica de GH em ratos tratados agudamente com 15 e 150 µmols de lactato quando comparados com seus respectivos controles (100%), em diferentes tempos de sacrifício na fase clara. N=6 por grupo.

7.1.2.2 Expressão hepática do mRNA de IGF-I e das proteínas da ERK1 e SOCS3

A figura 5 ilustra a expressão do mRNA de IGF-I após 30', 60' e 120' do tratamento com 15 e 150 μ mol de lactato vs grupo controle. Observa-se uma aparente redução dela após 30' da injeção do lactato e retorno aos valores do grupo controle ao longo do tempo. Contudo as alterações observadas não foram significativamente diferentes. O mesmo ocorreu com o conteúdo total de ERK1 (figura 6) e SOCS3 (figura 7), proteínas envolvidas com a via de sinalização do GH, embora haja uma aparente tendência ao aumento de ambas em resposta a dose, principalmente após 30' da injeção de lactato.

Figura 5 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de IGF-I hepático.

Avaliação da expressão gênica do IGF-I hepático normalizada pela expressão gênica da constitutiva ribossomal RPL19, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase clara. N= 4 por grupo.

Figura 6 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de ERK1 hepática.

Avaliação do conteúdo da ERK 1 hepática normalizada pelo ponceau como constitutiva, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase clara. N= 4 por grupo.

Figura 7 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de SOCS3 hepática.

Avaliação do conteúdo da SOCS 3 hepática normalizada pelo ponceau como constitutiva, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase clara. N= 4 por grupo.

7.2 AGUDO/ ESCURO

Os experimentos intitulados Agudo/ Escuro ocorreram na fase escura, momento em que se estabelece a maior atividade metabólica dos animais. Da mesma forma que o estudo realizado no claro, a lactacidemia (Figura 8) e a glicemia (Figura 9) dos animais tratados com lactato e sacrificados na fase escura não variaram de forma significativa durante o experimento ($P > 0,05$).

7.2.1 Efeito da administração de lactato ao longo do tempo sobre a lactacidemia e glicemia de ratos

Figura 8 - Efeito da injeção de lactato sobre a lactacidemia.

Avaliação da lactacidemia de animais tratados com lactato a 15 e 150 μmols em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura. N= 4 por grupo.

Figura 9 - Efeito da injeção de lactato sobre a glicemia.

Avaliação da glicemia de animais tratados com lactato a 15 e 150 μmols em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura. N = 4 por grupo.

7.2.2 Efeito da administração de lactato sobre o eixo somatotrófico

7.2.2.1 Expressão gênica e concentração sérica do GH

Nota-se, na figura 10, que a expressão gênica do GH dos animais que foram tratados com 15 e 150 μmols de lactato apresentou elevação de aproximadamente 5 vezes dos valores do grupo controle, após 30' do tratamento. Após 60' do tratamento, o conteúdo do mRNA do GH dos grupos tratados com 15 e 50 μmols de lactato diminuíram para valores superior ao do grupo controle, contudo, a alteração não foi considerada estatisticamente significativa. Aos 120' da injeção de lactato o conteúdo de mRNA do GH atingiu valores similares aos do grupo controle.

Figura 10 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de GH.

Avaliação da expressão gênica do GH hipofisário normalizada pela constitutiva ribossomal RPL19, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura. *** $P < 0,001$ vs controle. N= 5 por grupo.

Os dados apresentados pela figura 11 mostram que injeções de 150 μmols aumentam consideravelmente a concentração sérica de GH para todos os tempos analisados quando comparado com seu controle. Esse aumento é similar aos 30' do tratamento com 15 μmols de lactato, todavia a concentração sérica de GH retorna a patamares semelhantes aos basais para os demais tempos.

Figura 11 - Efeito da injeção de lactato sobre a variação sérica de GH.

Avaliação da variação sérica de GH em ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mols de lactato quando comparados com seus respectivos controles (100%), em diferentes tempos de sacrifício na fase escura. * $P < 0,05$ vs controle interno. N= 5 por grupo.

7.2.2.2 Expressão hepática do mRNA de IGF-I e das proteínas pJNK, pJAK2, ERK1 e SOCS3

Quanto ao conteúdo do mRNA do IGF-I, não observamos alterações significativas em relação ao grupo controle após 30 minutos dos tratamentos. No entanto, após 60 minutos da injeção, os animais tratados com 15 μ mols de lactato apresentaram aumento significativo na expressão do mRNA de IGF-I hepático em relação ao grupo controle. Esse aumento não foi encontrado em nenhum outro tempo/grupo de tratamento estudado. Ao contrário, observamos uma redução do conteúdo de mRNA de IGF-I hepático após 120' (Figura 12).

Figura 12 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de IGF-I hepático.

Avaliação da expressão gênica do IGF-I hepático normalizada pela expressão gênica da constitutiva ribossomal RPL19, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura. * $P < 0,05$ vs controle. N= 3 por grupo.

As figuras 13, 14, 15 e 16 ilustram a expressão de pJNK, pJAK2, ERK1 e SOCS3 em 30', 60' e 120' após a administração aguda de lactato nas doses de 15 e 150 μmols. Não observamos quaisquer alterações significativas no conteúdo das mesmas em resposta ao lactato.

Figura 13 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de pJNK hepática.

Avaliação do conteúdo da pJNK hepático normalizada pelo ponceau como constitutiva, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura. N= 4 por grupo.

Figura 14 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de pJAK2 hepática.

Avaliação do conteúdo da pJAK 2 hepático normalizada pelo ponceau como constitutiva, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura. N=4.

Figura 15 - Efeito da infusão de lactato sobre conteúdo de ERK1 hepática.

Avaliação do conteúdo da ERK1 hepático normalizada pelo ponceau como constitutiva, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μ mol de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura. N= 4 por grupo.

Figura 16 - Efeito da infusão de lactato sobre conteúdo de SOCS3 hepática.

Avaliação do conteúdo da SOCS3 hepático normalizada pelo ponceau como constitutiva, de ratos tratados agudamente com 15 e 150 μmols de lactato em diferentes tempos de sacrifício, na fase escura. N= 4 por grupo.

7.3 ESTUDO CRÔNICO/ INFUSÃO CONTÍNUA

7.3.1 Efeito da administração de lactato por 180 minutos ao longo do tempo sobre a lactacidemia e glicemia de ratos

Os experimentos intitulados Crônico/ Infusão Contínua foram realizados em ambas as fases do dia, escura e clara. Durante todo o período de infusão (180') foram coletadas amostras de sangue para avaliar as concentrações de lactato (Figura 17) e a glicemia (Figura 18), mas, da mesma forma que os estudos agudos realizados anteriormente, a avaliação desses parâmetros nos tratamentos com 15 e 150 μmols de lactato não mostrou variações significativas durante todo experimento ($P > 0,05$).

Figura 17 - Efeito da infusão de lactato sobre a lactacidemia.

Avaliação da lactacidemia nos tempos 60', 120' e 180' de animais tratados cronicamente com 15 e 150 µmols de lactato, nas fases clara e escura. N= 4 por grupo.

Figura 18 - Efeito da infusão de lactato sobre a glicemia.

Avaliação da glicemia nos tempos 60', 120' e 180' de animais tratados cronicamente com 15 e 150 µmols de lactato, nas fases clara e escura. N= 3 por grupo.

7.3.2 Efeito da administração de lactato por 180 minutos sobre o eixo somatotrófico

7.3.2.1 Expressão gênica e proteica hipofisária e concentração sérica do GH

A expressão gênica do GH de ratos tratados com 15 μ mol de lactato e sacrificados após 180', na fase escura, se mostrou 3 vezes maior do que a observada no grupo controle (4.322 ± 0.334 vs 1.501 ± 0.594 *Fold Change*). Contudo, a mesma dose de lactato infundida em animais que se encontravam na fase clara não provocou nenhuma alteração na expressão do mRNA de GH (Figura 19).

Já, os animais que receberam 150 μ mol de lactato por infusão, independentemente da fase em que se encontravam, não apresentaram nenhuma alteração no conteúdo de mRNA de GH quando comparados com o grupo controle.

Figura 19 - Efeito da infusão de lactato sobre a expressão gênica de GH.

Avaliação da expressão gênica do GH normalizada pelo RNA ribossomal RPL19, de ratos cronicamente tratados com 15 e 150 μ mol de lactato, nas fases clara e escura. *** $P < 0,001$ vs controle. N= 5 por grupo.

O conteúdo de GH hipofisário não se mostrou significativamente alterado para nenhuma das duas concentrações de lactato infundidas, bem como para nenhuma das fases estudadas durante o tratamento. Além disso, não foi possível verificar nenhuma interação entre os dois fatores, mesmo com respostas semelhantes para ambas às doses (Figura 20).

Figura 20 - Efeito da infusão de lactato sobre conteúdo proteico de GH hipofisário.

Avaliação do conteúdo do GH hipofisário normalizada pelo ponceau como constitutiva, de ratos tratados cronicamente com 15 e 150 µmols de lactato, nas fases clara e escura. N= 4 por grupo.

A figura 21 mostra que os animais do grupo controle que receberam salina durante os 180' de experimento continham concentrações de GH séricas significativamente diferentes, na qual os animais tratados na fase clara apresentavam um maior conteúdo do que os controles tratados na fase escura.

Nota-se que a porcentagem de GH sérico varia de forma distinta à administração de lactato, sendo essa, fortemente relacionado à fase do tratamento. A concentração do GH sérico do grupo submetido à infusão de 15 µmols de lactato na fase escura se mostra aumentado em aproximadamente 30 vezes quando comparado com seu controle. Esse aumento é um pouco menor ao do grupo tratado com a dose de 150 µmols de lactato da mesma fase.

Contudo, as mesmas doses de lactato provocaram efeitos inversos aos dos dois grupos tratados (15 e 150 µmols de lactato) na fase clara. Nesta ocasião ocorre uma diminuição significativa da concentração de GH sérico.

Figura 21 - Efeito da infusão de lactato sobre a variação sérica de GH.

Avaliação da variação sérica de GH de ratos tratados com 15 e 150 μ mols de lactato por 180' quando comparados com controle (100%), nas fases clara e escura. * $P < 0,02$ vs controle. N= 4 por grupo.

Em relação ao mRNA de IGF-I hepático, verificou-se que os animais controle tratados com salina no fase escura apresentaram conteúdo de transcritos relativamente menor, embora não significativo, que os controles da fase clara. Esta leve diferença se iguala na dose de 15 μ mols e retorna a uma menor expressão quando os animais foram tratados com 150 μ mols de lactato (Figura 22).

Quando os animais da fase clara foram tratados com lactato na concentração de 150 μ mols apresentaram uma tendência a aumentar o conteúdo de mRNA de IGF-I, contudo o tratamento na dose de 15 μ mols de lactato não alterou a expressão de mRNA de IGF-I hepático.

Figura 22 - Efeito da infusão de lactato sobre a expressão gênica de IGF-I hepático.

Avaliação da expressão gênica do IGF-I hepático normalizado pelo gene ribossomal RPL19, de ratos tratados cronicamente com 15 e 150 μmols de lactato, nas fases clara e escura. N= 3 por grupo.

8 DISCUSSÃO

Considerando-se que a concentração de GH circulante aumenta durante o exercício, condição em que o lactato aumenta nos músculos e, em seguida, na circulação, e sabendo-se que o lactato tem sido apontado como um possível sinalizador que participa do controle da síntese e secreção de alguns hormônios, inclusive da Prl (DE MEIRLEIR et al., 1985), buscou-se nesse estudo avaliar se o lactato poderia promover elevação da expressão do gene e da liberação do GH, contribuindo com a elevação do GH circulante. Avaliou-se também a expressão do mRNA do IGF-I hepático, já que há uma correlação positiva entre esta e a concentração de GH circulante (DE CASTRO BARBOSA et al., 2009; DOMENÉ et al., 1993; GERLINGER-ROMERO et al., 2011).

Nos experimentos foram avaliados os parâmetros supracitados ao fim da infusão contínua de lactato por 180 minutos, bem como após a sua administração aguda, para os tempos de 30', 60' e 120' da injeção. As amostras foram coletadas de animais que se encontravam na fase clara ou escura do período de 24 h, na tentativa de identificar possíveis diferenças de respostas e correlacioná-las à atividade dos animais, já que os roedores são animais de hábito noturno.

Não foram observadas alterações na lactacidemia dos animais tratados com 15 ou 150 μ mol de lactato, para os tempos 30', 60' e 120' do tratamento agudo ou dos tempos de 60', 120' e 180' do tratamento crônico, tanto na fase clara quanto escura do período de 24 h (Figura 1, 8 e 17). É possível que a não detecção do aumento da lactacidemia no estudo agudo se deva ao fato de que as medições foram realizadas em tempos em que essa alteração já teria se dissipado, já que estudos preliminares realizados por nosso grupo mostraram que o aumento da mesma acontece por volta de 7 minutos da administração de lactato. Aos 30 minutos, a concentração volta ao nível basal, que, no caso desse estudo, foi de aproximadamente 3 mM, corroborando os dados de Ferreira et al. (2007).

Acredita-se que a manutenção da lactacidemia nos grupos que receberam infusão contínua de lactato se deva à rápida captação deste metabólito pelos diferentes tecidos, como fígado, músculos e SNC (VAN HALL et al., 2009), onde são utilizados como possível fonte de energia, ou ainda, no caso do fígado, também como substrato gliconeogênico. Assim, é possível que na presente situação experimental tenha ocorrido uma interação do lactato da corrente sanguínea com esses tecidos, impossibilitando o seu acúmulo sérico, como seria observado em uma situação de esforço físico intenso e contínuo.

Sabe-se também que nessa condição experimental há uma instantânea ação dos rins em secretar o lactato na urina, conforme mostram os estudos de Yanase et al. (2008), que identificaram a expressão de diversas subunidades de MCTs na membrana baso-lateral e na membrana apical do túbulo renal de camundongos, mostrando que os rins são órgãos fundamentais para a regulação da concentração de lactato no sangue e dos íons cotransportados.

Outra possibilidade seria que, nessa condição experimental, o lactato estivesse sendo convertido à glicose pela gliconeogênese hepática. No entanto, não detectamos alteração na glicemia, o que pode indicar que a glicose produzida pode estar sendo armazenada em glicogênio no próprio fígado (Figura 2, 9 18).

Os resultados obtidos no estudo agudo vão ao encontro da hipótese de que o lactato seja um possível fator estimulador da expressão gênica do GH, já que foi observado que 30' após a sua injeção, nas doses de 15 e 150 μ mol, ocorre um nítido aumento do conteúdo do mRNA do GH no escuro, fase em que a atividade metabólica desses animais encontra-se aumentada (figura 10). Pode-se inferir, portanto, que o lactato gerado durante a atividade física, é potencialmente um fator que contribui com a elevação da expressão do gene do GH observada nessa situação, sem descartar a importância de outros fatores apontados anteriormente.

Observou-se que após 60' e 120' do tratamento dos animais que se encontravam na fase escura, o conteúdo de mRNA do GH decaí progressivamente, em ambas as doses de lactato utilizadas, chegando à valores semelhantes aos dos seus respectivos controles. Isso mostra que a resposta da expressão gênica do GH a uma única injeção do metabólito é fugaz (30') e independente da dose administrada, tanto para a dose de 15 e 150 μ mol (figura 10).

Simultaneamente a elevação da expressão gênica de GH no somatotrofo aos 30', mostrou-se que as mesmas doses provocam um rápido aumento da concentração do GH sérico (Figura 11), indicando uma rápida extrusão do GH armazenado em vesículas nos somatotrofos para a circulação. Sabe-se que o lactato é uma importante fonte de ATP, de forma que a sua metabolização, por meio da sua conversão a piruvato e ativação da fosforilação oxidativa, poderia elevar o conteúdo de ATP citossólico. Sabe-se também que os somatotrofos apresentam expressão de canais de K^+ dependentes de ATP. Desta forma é possível que a geração de ATP do lactato nessas células possa levar ao fechamento desses canais de K^+ , levando à despolarização da membrana plasmática, com consequente abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependente, o que elevaria a concentração de Ca^{2+} no citoplasma e

promoveria a extrusão de vesículas contendo GH já existentes no somatotrofo (PELLERIN, 2003).

O incremento da concentração sanguínea de GH na dose de 15 μ mol de lactato exerceu uma resposta efetiva sobre o conteúdo do mRNA do IGF-I hepático (Figura 12). Isso porque, após 60' do tratamento com a dose de 15 μ mol de lactato, os animais tratados na fase escura apresentavam uma elevação significativa desse parâmetro, sugerindo que o GH secretado na circulação é uma isoforma ativa e capaz de exercer sua ação hormonal sobre os demais tecidos, já que, ao menos no fígado, órgão que responde prontamente ao GH elevando a expressão de mRNA de IGF-I, observou-se nítido aumento deste parâmetro.

A redução do GH sérico no tempo de 60' para a dose de 15 μ mol pode ser o reflexo de uma retroalimentação negativa causada pelo próprio aumento prévio do GH sérico, que, como se sabe, exerce um rápido efeito estimulador da liberação somatostatina, hormônio hipotalâmico que inibe a secreção de GH, bem como pelo provável aumento de IGF-I circulante, cujos efeitos inibitórios sobre a síntese/secreção do GH no somatotrofo são bem conhecidos. É provável que essa rápida queda na concentração de GH circulante remova, subsequentemente, o efeito de retroalimentação negativa do próprio GH e do IGF-I sobre a hipófise, o que poderia explicar o aumento significativo do GH na corrente sanguínea, aos 120 minutos da injeção do lactato (Figura 11).

Apesar de mostrar que apenas após 30' da injeção de 15 μ mol de lactato ocorre o aumento do conteúdo sérico de GH, verificamos que a elevação da concentração sérica de GH para a dose de 150 μ mol de lactato se mostrou continuamente elevada durante todo o experimento. Surpreendentemente, a manutenção dessa elevação não alteram o conteúdo de mRNA do IGF-I hepático nos tempos estudados, evidenciando assim, uma possível ausência da retroalimentação negativa do IGF-I sobre a secreção de GH. Esse dado corrobora ao estudo de Maiter et al. (1988), que mostraram que a resposta do IGF-I ao GH é dependente da administração deste hormônio ser contínua ou intermitente, condições em que o IGF-I não se altera ou aumenta, respectivamente.

Embora o aumento da expressão gênica do IGF-I no fígado seja uma clara evidência de que nessa condição experimental o GH atuou nesse tecido desencadeando o seu efeito biológico, não observou-se quaisquer alterações na expressão das proteínas da sua cascata de sinalização (pJNK, pJAK2, ERK1 e SOCS3) (Figura 13, 14, 15 e 16). Sabe-se que a indução da expressão de IGF-I hepático pelo GH envolve a via de sinalização da STAT 5b, proteína cuja expressão não foi avaliada ainda. Dessa forma, pretende-se adquirir anticorpos

específicos para STAT 5b total e fosforilada, para buscar o melhor entendimento das bases moleculares envolvidas nessa elevação da expressão gênica o IGF-I induzida pelo GH.

Em resumo, evidenciou-se nos animais tratados agudamente na fase escura com lactato, em ambas as concentrações descritas, um aumento da atividade do eixo somatotrófico, que parece ser desencadeada a nível central, já que aos 30 minutos da injeção de lactato detectamos aumento do conteúdo de mRNA na hipófise e aumento do GH sérico, seguindo-se alterações no conteúdo de mRNA do IGF-I. As alterações subsequentes do conteúdo de mRNA do GH e do GH sérico ao longo do experimento parecem decorrer dos efeitos de retroalimentação negativa desencadeada pelo aumento do GH sérico e provavelmente do IGF-I circulante.

O fato de ter sido detectado um aumento rápido do GH sérico em resposta ao lactato sugere que esse procedimento tenha desencadeado um aumento da liberação de GHRH. No entanto, é possível que o rápido aumento do conteúdo do mRNA do GH na hipófise resulte, inicialmente, de uma alteração pós-transcricional no mRNA do GH, de modo a promover um aumento da sua estabilidade e/ou meia-vida, já que, embora o GHRH seja reconhecido como um hormônio que aumenta a expressão do gene do GH. Essa resposta seria um pouco mais demorada, já que o GHRH atua primeiramente aumentando a expressão do gene que codifica a proteína Pit-1, a qual atua como fator transcricional indutor da expressão do gene do GH (STRUTHERS; GADDY-KURTEN; VALE, 1992). Assim, se hipotetiza que o aumento do mRNA do GH detectado resulte do envolvimento desses dois mecanismos, tema que pode ser explorado futuramente.

É interessante que esses mesmos parâmetros, quando avaliados na fase clara do período de 24 h, não foram alterados pela injeção do lactato, mostrando que há uma resposta diferencial do eixo somatotrófico ao lactato, que depende fatores relacionados ao ciclo claro/escuro, o qual, como se sabe, está diretamente relacionado ao período de atividade dos roedores.

Quando avaliou-se esses mesmos parâmetros após a infusão de lactato por 180' observou-se que, na concentração de 15 μ mols, houve um aumento do conteúdo do mRNA do GH, bem como da concentração sérica do GH, eventos que também ocorreram apenas quando esse procedimento foi efetuado na fase escura. Sabe-se que nessa fase a atividade metabólica dos animais se encontra aumentada, o que exige uma maior demanda energética, situação em que a elevação do GH seria benéfica.

Adicionalmente, nessa fase ocorre aumento da secreção de melatonina, hormônio que exerce um fraco efeito estimulante sobre a secreção de GH, o qual é potencializado quando se

administra GHRH, ou quando se inibe a liberação de SS (VALCAVI et al., 1993). Dessa forma é possível que a infusão contínua de lactato possa ter promovido uma ação estimulante da liberação do GHRH ou inibitória de SS, o que poderia explicar a manutenção do elevado conteúdo do mRNA do GH (Figura 19) e do GH sérico por 180' vs o grupo controle na fase escura (Figura 21).

Sabe-se que 90% dos neurônios orexígenos que se localizam na região do núcleo arqueado do hipotálamo, como os que secretam o Agouti-related peptide (AgRP), apresentam transportadores de lactato (MCT_{1/2}) inseridos em suas membranas plasmáticas tendo sido detectado aumento da captação de lactato por esses neurônios, (CORTES-CAMPOS et al., 2013). Assim, acredita-se que numa situação de aumento da lactacidemia esses neurotransmissores sejam liberados, desencadeando assim o comportamento de ingestão alimentar. Sabe-se também que o AgRP é liberado simultaneamente com o NPY, que além de ser orexígeno, é um importante estimulador da liberação de GHRH.

Portanto, é possível que a elevação do conteúdo de mRNA de GH na hipófise, possa decorrer de um aumento da liberação de GHRH em resposta ao lactato, possibilidade que merece ser investigada. Sabe-se também que a melatonina aumenta o transporte de lactato para o fígado (MAZEPA et al., 2000), substrato este que, em conjunto com o aumento do GH, poderá ter contribuição importante para a produção hepática de glicose e manutenção da glicemia no período de maior atividade dos roedores, que é o período noturno.

Observou-se que o aumento do mRNA do GH na hipófise só ocorreu no grupo tratado com a menor dose de lactato, embora em ambos os grupos o GH sérico esteve elevado. Pode-se apontar também que a magnitude do aumento é menor no grupo tratado com a maior dose de lactato. Assim, é possível que a manutenção de elevadas concentrações de lactato por um período maior possam trazer respostas diferenciais na atividade de liberação do GHRH.

Conforme discutido nos experimentos agudos, a infusão contínua de lactato pode estar facilitando a extrusão das vesículas contendo GH no somatotrofo, dados esses que veem ao encontro dos apresentados na figura 20, já que nenhuma diferença significativa foi encontrada no conteúdo de GH no interior dessas células. Somado a isso, as doses de lactato utilizadas no experimento contínuo foram efetivas para aumentar significativamente o GH sérico dos ratos que se encontravam na fase escura do período, mostrando que o GH traduzido está sendo secretado na corrente sanguínea e a possível inibição via retroalimentação negativa não esteja suprimindo sua expressão em virtude de uma liberação contínua de GHRH que se contrapõe a esse efeito.

Vale ressaltar também que a concentração de GH na corrente sanguínea dos animais controles na fase clara se mostrava aproximadamente 100% maior que as concentrações analisadas do mesmo grupo de animais que se encontravam na fase escura. Essa diferença entre períodos poderia decorrer do fato de que a fase clara do período de 24 h é o período de menor atividade dos camundongos, que corresponde ao período de “sono” quando se sabe que a concentração de GH aumenta (SINHA et al., 1977).

Assim como a manutenção das elevadas das concentrações séricas de GH dos grupos tratados com 150 μ mol de lactato, mostrados nos experimentos na fase escura do estudo agudo, não influenciaram o conteúdo de mRNA do IGF-I hepático dos mesmos, também não detectamos alterações nesse mesmo parâmetro para os animais tratados cronicamente na fase escura que obtiveram aumento na concentração sérica de GH. Ou seja, conforme estudos de Maiter et al. (1988) e nossos estudos agudos, que mostraram ser a resposta do IGF-I ao GH é dependente da sua concentração contínua ou intermitente, é plausível que uma possível manutenção de altos níveis de GH induzida pela infusão de lactato por 180' privilegie a ativação de outra via de sinalização correlacionada aos efeitos metabólicos do GH.

Assim, acredita-se que numa situação de exercício o lactato seja utilizado como substrato gliconeogênico pelo fígado, mas poderia igualmente, além dos outros fatores já conhecidos, elevar a expressão e secreção do GH, hormônio importante para ativar a gliconeogênese e, portanto, para manter a glicemia nessa situação.

Conforme comentado, o lactato também pode ser transformado em oxalacetato ou alanina, via piruvato, e ser utilizado como fonte de energia para o fígado, entre outros tecidos. Ainda, os hepatócitos periportais podem utilizar esse metabólito para a produção de glicogênio, bem como para a síntese de glicose (glicogeniogênese e gliconeogênese pelo ciclo de Cori, respectivamente). Se esses eventos estão ocorrendo em resposta à injeção de lactato, ainda é motivo de especulação. No entanto, no exercício físico, quando em paralelo ao aumento da lactato ocorre um aumento da atividade de todos os tecidos, seria bastante importante que, em adição aos demais mecanismos que garantem o incremento do GH, o lactato possa contribuir para a elevação do GH.

Todavia, o mecanismo pelo qual o lactato promoveu esse efeito ainda é desconhecido e merece ser explorado.

9 CONCLUSÃO

Nossos dados apontam que a injeção de lactato promove elevação do conteúdo de mRNA do GH e da sua concentração sérica e, a seguir, do mRNA do IGF-I hepático, o que é um claro indício de que o eixo somatotrófico esteja sendo ativado nessa circunstância. Há uma diferença importante na resposta ao lactato quando se avalia o seu efeito no escuro, quando os roedores apresentam aumento da sua atividade metabólica e locomotora, e no claro, quando o oposto ocorre, o que sugere uma relação da atividade metabólica e locomotora dos animais com a resposta ao lactato observada. Contudo, verificou-se que a estimulação contínua da secreção de GH pode ativar outra via de sinalização hepática, sobrepondo a via da STAT, atenuando a expressão gênica de IGF-I. Nossos dados colocam pela primeira vez o lactato como um regulador da atividade do eixo somatotrófico durante o exercício físico, já que nessa condição a sua produção e concentração sanguínea encontram-se elevadas.

Conforme comentado anteriormente, é possível que o aumento da secreção de melatonina na fase escura do período de 24 h, possa estar implicado nessa resposta diferencial do eixo somatotrófico ao lactato, já que este hormônio, apesar de exercer um fraco efeito estimulante sobre a secreção de GH, atua de forma a potencializar essa ação quando se administra GHRH, ou quando se inibe a liberação de SS simultaneamente (VALCAVI et al., 1993). Essa informação vai ao encontro da nossa hipótese de que o lactato esteja agindo centralmente para promover a sua ação, sem descartar a possibilidade de uma atuação dele na hipófise, aumentando a secreção de GH. Esses dados, se comprovados, poderiam abrir novas perspectivas terapêutica para tratamento de indivíduos com redução da secreção de GH.

REFERÊNCIAS*

- BERMANN, M. et al. Negative feedback regulation of pulsatile growth hormone secretion by insulin-like growth factor I. Involvement of hypothalamic somatostatin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 1, p. 138–145, 1994.
- BONEN, A. 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.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 581–585, 2006.
- CHOMCZYNSKI, P.; SOSZYNSKI, P. A.; FROHMAN, L. A. Stimulatory effect of thyroid hormone on growth hormone gene expression in a human pituitary cell line. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 77, n. 1, p. 281–285, 1993.
- CLEMMONS, D. R. Involvement of insulin-like growth factor-I in the control of glucose homeostasis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 620–625, 2006.
- CLEMMONS, D. R.; VAN WYK, J. J. Factors controlling blood concentration of somatomedin C. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 113–143, 1984.
- CORTES-CAMPOS, C. et al. MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62532, 2013.
- DE CASTRO BARBOSA, T. et al. Potential role of growth hormone in impairment of insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue, and liver of rats chronically treated with arginine. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2080–2086, 2009.
- DE MEIRLEIR, K. L. et al. Exercise-induced prolactin release is related to anaerobiosis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 6, p. 1250–1252, 1985.
- DELITALA, G. et al. Dopaminergic and cholinergic influences on the growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in man. **Neuroendocrinology**, v. 45, n. 3, p. 243–247, 1987.
- DÍAZ-TORGA, G. et al. Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1270–1279, 2002.
- DOMENÉ, H. et al. Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I-binding protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats. **Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 675–682, 1993.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ELLIS, S.; VODIAN, M. A.; GRINDELAND, R. E. Studies on the bioassayable growth hormone-like activity of plasma. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 34, p. 213–238, 1978.

FAVERO, T. G. et al. Metabolic end products inhibit sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and $[^3\text{H}]$ ryanodine binding. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 78, n. 5, p. 1665–1672, 1995.

FERREIRA, J. C. B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 34, n. 8, p. 760–765, 2007.

FITTS, R. H.; HOLLOSZY, J. O. Lactate and contractile force in frog muscle during development of fatigue and recovery. **The American Journal of Physiology**, v. 231, n. 2, p. 430–433, 1976.

FODOR, M. et al. Growth hormone-releasing hormone, somatostatin, galanin and beta-endorphin afferents to the hypothalamic periventricular nucleus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 8, n. 1, p. 61–73, 1994.

FREGOSI, R. F.; DEMPSEY, J. A. Arterial blood acid-base regulation during exercise in rats. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, v. 57, n. 2, p. 396–402, 1984.

GARCIA, C. K. et al. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 4, p. 1843–1849, 1995.

GERLINGER-ROMERO, F. et al. Chronic supplementation of beta-hydroxy-beta methylbutyrate ($\text{HM}\beta$) increases the activity of the GH/IGF-I axis and induces hyperinsulinemia in rats. **Growth Hormone & IGF Research: Official Journal of The Growth Hormone Research Society and The International IGF Research Society**, v. 21, n. 2, p. 57–62, 2011.

GLADDEN, L. B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **The Journal of Physiology**, v. 558, pt. 1, p. 5–30, 2004.

GODFREY, R. J.; MADGWICK, Z.; WHYTE, G. P. The exercise-induced growth hormone response in athletes. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 33, n. 8, p. 599–613, 2003.

GORDON, G. R. J. et al. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. **Nature**, v. 456, n. 7223, p. 745–749, 2008.

GOSSELINK, K. L. et al. Afferent input from rat slow skeletal muscle inhibits bioassayable growth hormone release. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 88, n. 1, p. 142–148, 2000.

HASHIMOTO, Y. et al. Construction of a specific and sensitive sandwich enzyme immunoassay for 20 kDa human growth hormone. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 77–85, 1998.

HOLLOWAY, R. et al. Effect of lactate therapy upon cognitive deficits after traumatic brain injury in the rat. **Acta Neurochirurgica**, v. 149, n. 9, p. 919–927; discussion 927, 2007.

KAMEGAI, J. et al. Hypothalamic/pituitary-axis of the spontaneous dwarf rat: autofeedback regulation of growth hormone (GH) includes suppression of GH releasing-hormone receptor messenger ribonucleic acid. **Endocrinology**, v. 139, n. 8, p. 3554–3560, 1998.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656–660, 1999.

KRAEMER, W. J.; RATAMESS, N. A. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 35, n. 4, p. 339–361, 2005.

LING, B. et al. D-Lactate altered mitochondrial energy production in rat brain and heart but not liver. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 6, 2012.

MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. **News in Physiological Sciences: An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 14, p. 177–182, 1999.

MAITER, D. et al. Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin-C/insulin-like growth factor I and liver GH receptors in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, v. 123, n. 2, p. 1053–1059, 1988.

MARKOWITZ, S. M.; ARENT, S. M. The exercise and affect relationship: evidence for the dual-mode model and a modified opponent process theory. **Journal of Sport & Exercise Psychology**, v. 32, n. 5, p. 711–730, 2010.

MATSUSE, H. et al. Plasma growth hormone is elevated immediately after resistance exercise with electrical stimulation and voluntary muscle contraction. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 222, n. 1, p. 69–75, 2010.

MAZEPA, R. C. et al. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. **Life Sciences**, v. 66, n. 2, p. 153–160, 2000.

MCCULLAGH, K. J. et al. Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. **The American Journal of Physiology**, v. 271, n. 1 Pt 1, p. E143–150, 1996.

MCCULLAGH, K. J.; BONEN, A. Reduced lactate transport in denervated rat skeletal muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 268, n. 4 Pt 2, p. R884–888, 1995.

NIELSEN, O. B.; DE PAOLI, F.; OVERGAARD, K. Protective effects of lactic acid on force production in rat skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 536, n. Pt 1, p. 161–166, 2001.

PARSONS, M. P.; HIRASAWA, M. ATP-sensitive potassium channel-mediated lactate effect on orexin neurons: implications for brain energetics during arousal. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 24, p. 8061–8070, 2010.

PELLERIN, L. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. **Neurochemistry International**, v. 43, n. 4-5, p. 331–338, 2003.

PILEGAARD, H. et al. Distribution of the lactate/H⁺ transporter isoforms MCT1 and MCT4 in human skeletal muscle. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 5 Pt 1, p. E843–848, 1999.

ROJAS VEGA, S. et al. Bicarbonate reduces serum prolactin increase induced by exercise to exhaustion. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 38, n. 4, p. 675–680, 2006.

ROJAS VEGA, S.; STRÜDER, H. K.; HOLLMANN, W. Plasma prolactin concentration increases after hypercapnia acidosis. **Hormone and Metabolic Research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 35, n. 10, p. 598–601, 2003.

ROOT, A. W.; ROOT, M. J. Clinical pharmacology of human growth hormone and its secretagogues. **Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 2, n. 1, p. 27–52, 2002.

SAHLIN, K. et al. Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 367, n. 2, p. 143–149, 1976.

SAUKKONEN, T. et al. Dose-dependent effects of recombinant human insulin-like growth factor (IGF)-I/IGF binding protein-3 complex on overnight growth hormone secretion and insulin sensitivity in type 1 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 9, p. 4634–4641, 2004.

SCHIFFER, T. et al. Lactate infusion at rest increases BDNF blood concentration in humans. **Neuroscience Letters**, v. 488, n. 3, p. 234–237, 2011.

SHIBASAKI, T. et al. Plasma GH responses to GHRH and insulin-induced hypoglycemia in man. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 60, n. 6, p. 1265–1267, 1985.

SINHA, Y. N. et al. Serum and pituitary concentrations of prolactin and growth hormone in mice during a twenty-four hour period. **Endocrinology**, v. 100, n. 3, p. 786–791, 1977.

STRUTHERS, R. S.; GADDY-KURTEN, D.; VALE, W. W. Activin inhibits binding of transcription factor Pit-1 to the growth hormone promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 23, p. 11451–11455, 1992.

TAKARADA, Y. et al. Effects of resistance exercise combined with moderate vascular occlusion on muscular function in humans. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 88, n. 6, p. 2097–2106, 2000.

THOMAS, C. et al. Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 3, p. 804–809, 2005.

VALCAVI, R. et al. Melatonin stimulates growth hormone secretion through pathways other than the growth hormone-releasing hormone. **Clinical Endocrinology**, v. 39, n. 2, p. 193–199, 1993.

VAN HALL, G. et al. Blood lactate is an important energy source for the human brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 29, n. 6, p. 1121–1129, 2009.

VANCE, M. L.; HARTMAN, M. L.; THORNER, M. O. Growth hormone and nutrition. **Hormone Research**, v. 38 Suppl 1, p. 85–88, 1992.

WIDEMAN, L. et al. Effects of gender on exercise-induced growth hormone release. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 87, n. 3, p. 1154–1162, 1999.

WIDEMAN, L. et al. Growth hormone release during acute and chronic aerobic and resistance exercise: recent findings. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 32, n. 15, p. 987–1004, 2002.

WILSON, M. C. et al. Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 26, p. 15920–15926, 1998.

YANASE, H. et al. Cellular expression of a sodium-dependent monocarboxylate transporter (Slc5a8) and the MCT family in the mouse kidney. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 5, p. 957–966, 2008.

ZAJAC, A.; WAŚKIEWICZ, Z.; PILIS, W. Anaerobic power, creatine kinase activity, lactate concentration, and acid-base equilibrium changes following bouts of exhaustive strength exercises. **Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association**, v. 15, n. 3, p. 357–361, 2001.