RAFAEL BARRERA SALGUEIRO

O papel do lactato na regulação neuroendócrina do eixo somatotrófico.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2018

RAFAEL BARRERA SALGUEIRO

O papel do lactato na regulação neuroendócrina do eixo somatotrófico.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana
Orientadora: Profª Drª Maria Tereza Nunes

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação.

SÃO PAULO

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barrera Salgueiro, Rafael
O papel do lactato na regulação neuroendócrina do eixo somatotrófico. / Rafael Barrera Salgueiro; orientadora Maria Tereza Nunes. -- São Paulo, 2018.
70 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hipotálamo. 2. Metabolismo. 3. Hormônio do Crescimento. 4. Eixo somatotrófico. 5. Lactato. I. Nunes, Maria Tereza, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Titulo da Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a _____/_____/_____, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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 **122** nas fls. **25** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Tereza Nunes,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Efeito do lactato na regulação neuroendócrina do eixo somatotrófico"* do qual participam o(s) aluno(s) **Rafael Barrera Salgueiro, Rafael Viana Croffi,** Pós-Doutorando **Rodrigo Peliciari Garcia,** 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 **18.11.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 19 de novembro de 2014.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a minha orientadora, Maria Tereza Nunes, pelo seu ímpeto de trazer sempre o melhor para mim, seu caráter e sua dedicação com os alunos seguiram o seu nome. Serei sempre grato por tudo.

A Leonice Poyares, que era muito mais do que uma profissional, sempre uma grande mãe para todos nós do laboratório. Ela sempre acreditou em mim.

Ao professor Luc Pellerin, por sua genialidade e tamanha colaboração com esse projeto, me hospedando em seu laboratório com muito entusiasmo. Toda a sua equipe, principalmente a Cendrine, Citlalli e Sarah, que me ensinaram muito e me apoiaram nos momentos de grandes renovações e desafios.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Ana K, Carol, Cecília, Croffi, Dias, Fred, Gísele, Já, Lucas, Luquinhas, Neto, Nina, Paula, Prévide, Renata e Yogi. Por estarem ao meu lado quando foi preciso e dividir todos os meus momentos.

Agradeço também à Lígia e sua família, por me ajudarem nos momentos de dificuldades, serão sempre lembrados com muita felicidade.

Aos colaboradores deste trabalho que tanto me ajudaram e se dispuseram para realização deste trabalho, Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto e Dr. Stanko S. Stojilkovic.

Aos professores Rui Curi, Luciana Caperuto e Fernando Abdulkader, pelas importantes contribuições no exame de qualificação.

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

Ao CNPq e a FAPESP/CAPES pelo apoio financeiro.

"O maior inimigo do conhecimento
não é a ignorância, mas sim a ilusão
de ter conhecimento."

Traduzido do inglês:

"The greatest enemy of the
knowledge is not the ignorance, it is
the illusion of knowledge."

Dr. Daniel Joseph Boorstin
1914-2004

ABSTRACT

Lactate is the product of pyruvate reduction, a fundamental reaction for intracellular pH control and the redox state of the cell. In the bloodstream, it diffuses into tissues expressing MCTs and is consumed as an important energy substrate. In my master's degree, we observed that lactate promotes elevation of GH synthesis/ secretion in rats. In this study, we intend to identify whether this metabolite could stimulate directly the hypothalamic and/or pituitary cells related to the somatotropic axis, as well as the potential mechanisms involved in this regulation. Our results show that lactate increases the activity of neurons in different hypothalamic regions, regulating the gene and protein expression of *Ghrh* and *Somatostatin* (*Sst*). Those events could be promoting post-transcriptional regulation of the *Gh* mRNA, which may reflect the increment of its transcript stability and content. In experiments with *Lit/ Lit* mice, we observed the importance of stimulating GHRH tone for the stimulation of GH expression. In experiments with $MCT_1^{+/-}$ KO mice we identified that lactate is a key part of exercise to activate the somatotrophic axis. Furthermore, we characterized that GH3 cells show lactate receptor mRNA expression (*Gpcr* 81) and 3 different isoforms of lactate transporters (*Mct* 1, 3, 4), in which we detect the intra and extra cellular GH content increased as a result of the lactate treatment. This last effect indicates a stimulus on the GH secretion, which is dependent of the extracellular Ca^{++} influx. Facing pharmacological inhibition of MCTs, the effect of lactate on the Gh mRNA increment is no longer reproduced. Thus, applying different experimental approaches, our work shows direct lactate actions, via membrane transporters, promoting increased GH synthesis and secretion, as well as hypothalamic expression of GHRH and SST. We concluded, therefore, that lactate promotes an increase in the activity of the somatotrophic axis acting at different levels of the same, which can contribute to the high concentration of GH in response to physical exercise and places it as a potent central signaling factor of the significant body metabolic alterations.

Key words: Hypothalamus, Metabolism, Growth Hormone, Somatotrofic axis, Lactate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação piruvato/lactato.....13
Figura 2 - Protocolo experimental de exercício.....26
Figura 3 - Cultura de neurônios.....28
Figura 4 - Cultura de células GH3.....30
Figura 5 - Efeito da injeção de lactato sobre expressão proteica de EGR-1 hipotalâmico.....32
Figura 6 - Efeito da injeção de lactato sobre expressão gênica de *Ghrh* hipotalâmico.....34
Figura 7 - Efeito da injeção de lactato sobre expressão gênica de *Sst* hipotalâmico.....34
Figura 8 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de GHRH hipotalâmico.....35
Figura 9 - Efeito da injeção de lactato sobre o comprimento da cauda poli(A) do *Gh*.....36
Figura 10 - Efeito da injeção de lactato (1,5 µmols) sobre a concentração sérica de GH, ACTH, FSH, TSH e PRL de camundongos selvagens e *Lit/ Lit*.....37
Figura 11 - Efeito do exercício físico agudo sobre expressão de MCT_1 no hipotalâmico, hipófise e fígado de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/}$.....38
Figura 12 - Efeito do exercício físico em parâmetros funcionais e metabólicos de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.....40
Figura 13 - Efeito do exercício físico sobre a expressão de genes e de proteínas hipotalâmicas de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.....41
Figura 14 - Efeito do exercício físico sobre a expressão de GH de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.....44
Figura 15 - Efeito do exercício físico sobre a concentração de GH no soro de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/}$.....45
Figura 16 - Efeito do exercício físico sobre a expressão de IGF-1 hepático de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.....46
Figura 17 - Efeito do lactato e da inibição do seu transportador sobre a expressão gênica de *Gh* em células GH3.....47
Figura 18 – Efeito do lactato sobre o conteúdo de GH de células GH3.....48
Figura 19 - Efeito do lactato sobre o conteúdo de GH no meio de cultura de células GH3....48
Figura 20 - Efeito do lactato na concentração intracelular de cálcio em células GH3 cultivadas em meio contendo ou não cálcio.....50
Figura 21 - Efeito do lactato sobre a expressão gênica dos transportadores de lactato e seu receptor em células GH3.....50
Figura 22 - Efeito do lactato (10 mM) sobre a expressão de GHRH e SRIF de neurônios hipotalâmicos cultivados em cultura primária.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de primers.....21
Tabela 2 - Lista de anticorpos para Western Blotting.....23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....13

2 JUSTIFICATIVA.....18

3 OBJETIVO.....19

4 MATERIAL E MÉTODOS.....20

5 ANÁLISE ESTATISTICA.....31

6 RESULTADOS.....32

7 DISCUSSÃO.....54

8 CONCLUSÃO.....64

REFERÊNCIAS.....65

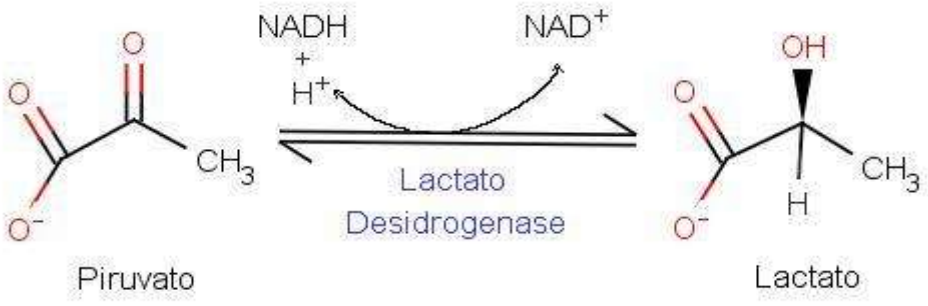
RESUMO

Lactato é o produto da redução do piruvato, reação fundamental para controle intracelular do pH e o estado redox celular. Na corrente sanguínea, ele se difunde aos tecidos que expressam MCTs e é consumido como um importante substrato energético. Nos estudos mostraram que o lactato promove elevação da síntese/secreção do GH em ratos. Neste estudo, pretendemos identificar se esse metabólito poderia estimular diretamente as células hipotalâmicas e/ou hipofisárias relacionadas com eixo somatotrófico, bem como seus potenciais mecanismos envolvidos nesse efeito. Nossos resultados mostram que o lactato aumenta a atividade de neurônios em diferentes regiões hipotalâmicas, elevando a expressão gênica de *Ghrh* e *Somatostatina* (*Sst*). Essas alterações estariam regulando efeitos pós-transcricionais sobre o mRNA de *Gh*, o que pode refletir na maior estabilidade e no conteúdo do seu transcrito. Os efeitos do lactato também foram estudados em animais *knockout* para receptor de GHRH, mostrando a importância de um tônus estimulatório do GHRH no aumento do conteúdo sérico do GH. Em experimentos com camundongos KO $MCT1^{+/-}$ demonstramos que o lactato é fundamental para a ativação do eixo somatotrófico em resposta ao exercício. Ainda, identificamos a expressão do receptor de lactato (*Gpcr*81) e de 3 diferentes isoformas de transportadores de lactato (*Mct*1, 3, 4) de células GH3, nas quais também detectamos elevação do conteúdo intra e extracelular de GH em resposta ao tratamento com lactato. Este último efeito indica o seu estímulo sobre a secreção de GH, que se mostrou dependente do influxo de Ca^{++} extracelular. Frente à inibição farmacológica dos MCTs, o efeito do lactato sobre o aumento do mRNA de *Gh* não é mais reproduzido. Em suma, utilizando diferentes abordagens experimentais, demonstramos que o lactato atua diretamente nos somatotrofos, via transportadores de membrana, promovendo aumento da síntese e secreção de GH, bem como no hipotálamo, aumentando a expressão de GHRH e SST. Conclui-se, portanto, que o lactato promove aumento da atividade do eixo somatotrófico atuando em diferentes níveis do mesmo, o que pode contribuir com a elevada concentração do GH em resposta ao exercício físico e o coloca como um potente sinalizador central de significativas alterações metabólicas corpóreas.

1 INTRODUÇÃO

O lactato é um ânion gerado a partir da redução do piruvato proveniente do processo de metabolização anaeróbia da glicose, por meio de uma reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Esta utiliza os íons H^+ e NADH acumulados no citossol, gerando NAD^+.

Figura 1 – Reação piruvato/lactato



Reação redox bidirecional de piruvato/lactato catalisada pela enzima lactato desidrogenase.

Quando a oferta de oxigênio está adequada às necessidades do tecido, o piruvato resultante da glicólise é preferencialmente oxidado dentro da mitocôndria a CO_2 e H_2O pelo ciclo de Krebs. Essa alimentação da cadeia respiratória na membrana interna da mitocôndria, juntamente com a utilização de coenzimas, permite a fosforilação do ADP a ATP, caracterizando um dos maiores processos de fonte de ATP intracelular.

Durante uma atividade física de alta intensidade e/ou de grande volume de esforço, a concentração de lactato na corrente sanguínea alcança valores elevados, o que depende do estado de treinamento físico do atleta. Neste contexto, análises da concentração plasmática de lactato de indivíduos sedentários que foram submetidos à corrida de longa distância mostraram uma elevação na ordem de 13.4 mM e o mesmo protocolo de esforço físico aplicado a indivíduos treinados a corridas de longa distância resultou em um pico de lactato ao redor de 9.7 mM (THOMAS et al., 2005).

Esse aumento advém de condições específicas pelas quais as células, principalmente as musculares, são submetidas. Este fenômeno resulta no aumento do consumo energético proveniente da contração muscular, que culmina no alcance do limiar máximo do oxigênio ofertado pelos pulmões e que não supre a demanda exigida pela mitocôndria. Assim, a

produção de ATP pela fosforilação oxidativa sofre saturação, sendo limitada pela atividade da enzima piruvato desidrogenase mitocondrial (GRANCHI et al., 2010).

Assim, com a diminuição da oxidação do piruvato na mitocôndria e com a contínua utilização da glicose devido à manutenção de elevada necessidade energética, o resultado é o acúmulo de piruvato e de íons H^+ no citossol. Esse resíduo da glicólise servirá de substrato para a enzima lactato desidrogenase, que favorecerá a reação de síntese do lactato intracelular.

O acúmulo do lactato citossólico culmina no seu efluxo para a corrente sanguínea, via transportadores transmembrânicos de monocarboxilato (MCT_1 a $_4$), por gradiente de concentração (ZAJAC; WAŚKIEWICZ; PILIS, 2001). Esse processo requer o cotransporte de outro íon H^+ na proporção 1:1, sendo este o mecanismo que mais contribui para a acidose metabólica do organismo, já que soma 50% dos íons H^+ circulantes durante o esforço físico, o que é essencial para a manutenção do pH intracelular (PILEGAARD et al., 1999).

A captação de lactato pelas células hepáticas é mediada por 3 principais isoformas de MCTs (1, 2 e 4). O $MCT_{1,}$ que exibe Km de 3,5 mM para lactato, é o mais importante dos MCTs e apresenta expressão ubíqua nos diferentes tecidos. É interessante comentar que o *knockout* de MCT_1 em camundongos promove uma resistência à aquisição de obesidade induzida pela dieta (LENGACHER et al., 2013), o que sugere que esses transportadores estejam envolvidos no controle do balanço energético corpóreo. Os MCT_2 e $_4$ apresentam Kms para lactato diferentes do MCT_1 e, ao contrário deste, são expressos de forma tecido-específica. O MCT_2 (Km de 0,74 mM) é o principal transportador de lactato neuronal, enquanto o MCT_4 (Km de 28 mM) é expresso basicamente em astrócitos (CARNEIRO; PELLERIN, 2015). Além desses transportadores, existe a expressão do MCT_3, que foi exclusivamente identificado no epitélio de retina (YOON et al., 1997).

Uma vez na circulação, o lactato se difunde pela membrana das células que expressam MCTs e que não estão saturados de lactato, exercendo assim diferentes papéis fisiológicos nessas células. No fígado, ele é oxidado novamente a piruvato, proporcionando uma rica fonte de carbono para a gliconeogênese, contribuindo para a manutenção da glicemia.

O conjunto desses transportadores possibilita o fluxo de lactato entre sangue e tecidos, em resposta à variação da sua concentração. Assim, nos músculos com predominância de fibras oxidativas há maior quantidade de transportadores de lactato, o que permite sua captação e oxidação à piruvato, substrato fundamental para a produção de energia pelo ciclo de Krebs (LING et al., 2012; MCCULLAGH et al. 1996). Do mesmo modo, YANASE e colaboradores (2008) identificaram diversas subunidades de MCTs dependentes de sódio na membrana basolateral e na membrana apical do túbulo renal de camundongos, dado indicativo

de que o lactato também pode ser excretado na urina, bem como utilizado como fonte de energia.

Sabe-se ainda que o lactato atravessa a barreira hematoencefálica e pode atingir células nervosas, de forma a atuar como substrato energético e/ou um importante sinalizador central (SMITH et al., 2003). Esse ânion pode ser consumido pelas células nervosas durante a atividade física, chegando a poupar cerca de 1/3 de todos os outros substratos utilizados pelo cérebro, como glicose e corpos cetônicos (RASMUSSEN, WYSS e LUNDBY, 2011; IDE e SECHER, 2000; VAN HALL et al., 2009; OVERGAARD et al., 2012).

Por meio da metabolização da glicose sérica pelas células da glia, que constituem cerca de 90% das células neurais, o lactato gerado é rapidamente transferido para os neurônios adjacentes por via de Lançadeiras de Lactato dos Astrócitos para os Neurônios (ANLS) (MAGISTRETTI; PELLERIN, 1999).

Estudo de Parsons e Hirasawa (2010) mostrou que o bloqueio dos MCTs com ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, em neurônios orexígenos depletados de glicose e com elevadas concentrações de lactato de sódio no meio de cultura, provoca o desaparecimento total da sua freqüência de disparos. Esta retorna ao basal no momento em que há o desbloqueio desses transportadores, sugerindo a participação do lactato no desencadeamento desses potenciais de ação, o colocando como um importante sinalizador metabólico.

As mais novas descobertas científicas colocam-no também como um importante regulador da atividade respiratória. Com o rápido aumento da sua concentração sanguínea em estado de hipóxia, o lactato ativa receptores Olf78 acoplados à proteína G de células quimiossensíveis do corpo carotídeo, despolarizando-as, o que contribui com a hiperventilação gerada nesse estado (CHANG et al., 2015).

Considerando a multiplicidade de eventos desencadeados por ele e sabendo-se que sua concentração sanguínea se eleva durante o exercício, situação em que ocorre um aumento da secreção de GH, por mecanismos já identificados (DELITALA et al., 1987; SHIBASAKI et al., 1985; KOJIMA et al., 1999), desenvolvemos um estudo que mostrou que a administração de lactato em ratos em repouso promoveu uma elevação da secreção do GH (Salgueiro et al., 2014), o que sugere sua contribuição para o aumento do GH no exercício, hormônio expresso pelas células somatotróficas, e regulado por diversos fatores, entre eles o estado metabólico (SPIESS; RIVIER; VALE, 1983; TANNENBAUM; BOWERS, 2001).

Nossos dados mostraram que ratos tratados com uma única injeção de lactato nas concentrações de 15 e 150 µmols, durante a fase escura (escotofase) do período de 24 h, apresentaram aumento da expressão gênica de *Gh* e *Igf*-I (SALGUEIRO et al., 2014). Esses

dados dão destaque à importância do lactato na ativação do eixo somatotrófico e sugerem sua ação sobre a atividade das células somatotróficas hipofisárias e/ou de neurônios hipotalâmicos que controlam a secreção de GH, hormônio que participa da manutenção da homeostase energética durante o exercício (GODFREY; MADGWICK; WHYTE, 2003).

Nosso estudo vai ao encontro de pesquisas em humanos que mostraram que durante o treinamento exaustivo em esteira (KRAEMER e RATAMESS, 2005; ROJAS VEGA et al., 2006) ou com a infusão de lactato (SCHIFFER et al., 2011) ocorre aumento da produção de *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), fatores de crescimento e da liberação de hormônios como prolactina, que poderiam estar associados aos efeitos benéficos da atividade física (DE MEIRLEIR et al., 1985; ROJAS VEJA, STRÜDER e HOLLMANN, 2003; ROJAS VEGA et al., 2006).

Além de agentes metabólicos, os principais reguladores da atividade dos somatotrofos são os hormônios produzidos por neurônios hipotalâmicos, entre eles o Hormônio Liberador de GH (GHRH) e a Somatostatina (SST). Os corpos celulares dos neurônios GHRH estão localizados principalmente nos núcleos arqueado e ventromedial do hipotálamo, enquanto que os da SST na região periventricular (FODOR et al., 1994).

O GHRH foi caracterizado e sequenciado pelos grupos Guillemin e de Rivier (1982), e qualificado como um importante estimulador da secreção e síntese de GH, por ativar receptores transmembrânicos acoplados à proteína G estimulatória (Gs) (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 SST, e que sua reposição exógena promove efeito inverso, demonstrando a importância do GH no controle da atividade de seu eixo.

A SST também é reconhecida por células somatotróficas regulando negativamente a produção de GH. A ação da SST ocorre por meio da ativação do receptor de SST, que é acoplado a proteína G inibitória (Gi), e resulta na diminuição da secreção e síntese de GH (ROOT; ROOT, 2002). Lesões no núcleo periventricular do hipotálamo, que possibilitaram uma redução de cerca de 80% do seu conteúdo na eminência mediana e 30% no próprio hipotálamo, foram seguidos de aumento na concentração sanguínea de GH (CRITCHLOW et al., 1981).

Nesse sentido, Wideman et al. (1999) mostraram que 30 min de exercício aeróbio de alta intensidade é 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 SST. Considerando que durante um exercício intenso essa região é banhada por altas concentrações de lactato, é possível que esse metabólito participe da secreção de GHRH.

O hipotálamo endócrino é uma importante região do sistema nervoso central que recebe inúmeras projeções de outras partes do cérebro e sinais provindos da circulação sistêmica. A somatória desses estímulos resulta no controle endócrino da hipófise. Há evidências de que neurônios hipotalâmicos que expressam abundantemente o MCT1 apresentam elevação das concentrações de ATP e NADH em resposta ao lactato, e não ao piruvato (AINSCOW et al., 2002). Assim, o aumento da concentração do lactato circulante poderia alterar o fluxo deste metabólito para as células e desencadear eventos nas mesmas, contribuindo para o controle da liberação de neurohormônios.

O conjunto dos dados apresentados coloca o lactato como um fator adicional que contribuiria para o aumento do GH em resposta ao exercício ou ao estado metabólico do indivíduo, atuando como um sinalizador da perturbação da homeostase energética (SALGUEIRO et al., 2014). No presente trabalho, exploramos a importância deste metabólito para a ativação do eixo somatotrófico, buscando identificar os mecanismos pelos quais seus efeitos são desencadeados.

2 JUSTIFICATIVA

A concentração do lactato sanguíneo, bem como a do GH, se eleva proporcionalmente à intensidade da atividade física. Sabendo-se que esse metabólito atinge diversas áreas do sistema nervoso e considerando nossos resultados obtidos no mestrado que demonstraram uma ativação do eixo somatotrófico pela administração de lactato em animais em repouso (SALGUEIRO et al., 2014), pretendeu-se explorar os potenciais alvos e mecanismos implicados nessa resposta. Uma vez que não se conhece na literatura trabalhos que atribuam ao lactato o papel de um agente sinalizador do eixo somatotrófico, este estudo se torna inovador, posto que pode caracterizar essa função e ampliar o conhecimento nessa área, trazendo perspectivas para sua utilização com finalidades terapêuticas.

3 OBJETIVO

Identificar as regiões hipotalâmicas que participam do controle da atividade do eixo somatotrófico e são responsivas ao lactato, e investigar se a hipófise seria um alvo direto deste metabólito, avaliando as repercussões do tratamento com lactato sobre a síntese e secreção de GH em modelos *in vivo* e *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A realização deste estudo envolveu a utilização de dois diferentes abordagens experimentais, conforme se segue:

4.1 ESTUDOS *IN VIVO*

Foram utilizados ratos Wistar; camundongos C57BL/6, *Lit/ Lit* e KO MCT1$^{+/-}$.

4.1.1 Ratos Wistar

Ratos Wistar (250 g) provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP foram mantidos, sob condições padronizadas de temperatura ambiental (24 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, com água e alimentação *ad libitum* (Protocolo registrado no CEAU # 122, p. 25, book 03). Número amostral de 5 a 10 animais/ grupo

Os animais receberam uma única injeção intraperitoneal (ip) de lactato de sódio nas concentrações de 10 mM ou 100 mM (Sigma-Aldrich), o que equivale à administração de 15 µmols ou 150 µmols de lactato de sódio, e de salina (0,9%), num volume de 1,5 ml no início da fase escura do ciclo, constituindo os grupos: **Lac 10 mM, Lac 100 mM** e **Controle**, respectivamente. Vale resaltar que alguns experimentos foram utilizados apenas a dose de 10 mM de lactato. Os animais foram eutanasiados após 30 e 60 min desses procedimentos para remoção do hipotálamo e hipófise. O sangue coletado do tronco para futuras determinações dos hormônios circulantes.

A escolha da fase escura do dia para os tratamentos levou em consideração estudos prévios (SALGUEIRO et al., 2014) que demonstraram que as alterações no eixo GH-IGF-I em resposta à administração de lactato ocorrem na escotofase, período em que os roedores apresentam maior atividade.

Como parte do experimento, na semana que antecedeu a injeção de lactato, os ratos passaram por um processo de adaptação ao manuseio e à injeção que ocorreu no dia do estímulo. Duas vezes ao dia, durante uma semana, os animais foram manipulados pelo experimentador e levemente perfurados com uma agulha, com objetivo de diminuir o estresse dos mesmos durante a experimentação e um possível resultado falso positivo.

4.1.1.1 Hipotálamo

Nesta estrutura foram avaliados os seguintes parâmetros:

4.1.1.1.1 Expressão gênica de *Ghrh* e *Sst*.

Para tal análise, o hipotálamo foi homogeneizado e submetido à extração do RNA total utilizando-se o método Trizol (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 2006). 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 SYBR Green PCR kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) e *primers* específicos para *Ghrh* e *Sst.* Para normalização do conteúdo de mRNA entre as diferentes amostras utilizamos os controles internos *Ciclofilina* e *Rpl19* (Tabela 1). Para a realização do PCR em tempo real utilizamos o aparelho Rotor Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1 - Lista de primers.

PRIMERS	SEQUÊNCIAS
Ghrh Sense	5'-ATGCCACTCTGGGTGTTCTTTG-3'
Ghrh Antisense (reverse)	5'-TCAAGCCTCCGCTGAAAGCTTC-3'
Sst Sense	5'-CCCAGACTCCGTCAGTTTCTG-3'
Sst Antisense (reverse)	5'-GGGCATCATTCTCTGTCTGGTT-3'
Npy Sense	5'-ATGCTAGGTAACAAGCGAATGG-3'
Npy Antisense (reverse)	5'-TGTCGCAGAGCGGAGTAGTAT-3'
Pomc Sense	5'-ATGCCGAGATTCTGCTACAGT-3'
Pomc Antisense (reverse)	5'-TCCAGCGAGAGGTCGAGTTT-3'
Gh Sense	5'-GAGTTCGAGCGTGCCTACATTC-3'
Gh Antisense (reverse)	5'-GCAGGAGAGCAGCCCATAGTTT-3'
Mct 1 Sense	5'-GGTGTCATTGGAGGTCTTGGG-3'
Mct 1 Antisense (reverse)	5'-GGCCAATGGTCGCTTCTTG-3'
Mct 2 Sense	5'-CAGGAGGTCCCATCAGTAGT-3'
Mct 2 Antisense (reverse)	5'-ACTTTTAGACTTCGCAGCAC-3'
Mct 3 Sense	5'-GGGTCATCACTGGCTTGGGT-3'
Mct 3 Antisense (reverse)	5'-GGAACACGGGACTGCCTGC-3'
Mct 4 Sense	5'-TGCGGCCCTACTCTGTCT-3'
Mct 4 Antisense (reverse)	5'-TCTTCCCGATGCAGAAGAAG-3'
Gpcr 81 Sense	5'-GAAGACCTGGAAGTCGAGCACT-3'
Gpcr 81 Antisense (reverse)	5'-TCCGAAGGGGTAGGCAGAT-3'
Igf-1 Sense	5′-AAGCCTACAAAGTCAGCTCG-3′
Igf-1 Antisense (reverse)	5′-GGTCTTGTTTCCTGCACTTC-3′
Ciclofilina Sense	5'-GGATTCATGTGCCAGGGTGG-3'
Ciclofilina Antisense (reverse)	5'-CACATGCTTGCCATCCAGCC-3'
Rpl19 Sense	5'-CCAATGAAACCAACGAAATCG-3'
Rpl19 Antisense (reverse)	5'-TCAGGCCATCTTTGATCAGCTT-3'
Polr2 Sense	5'-CCAATGAAACCAACGAAATCG-3'
Polr2 Antisense (reverse)	5'-TCAGGCCATCTTTGATCAGCTT-3'

Sequência dos *primers* que foram utilizados no PCR em tempo real.

4.1.1.1.2 Expressão da proteína GHRH.

O hipotálamo foi homogeneizado em solução tampão RIPA com inibidores de proteases (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, com 150 mM Cloreto de Sódio, 1% NP-40, 0,5% Deoxicolato de Sódio, 0,1% Dodecil sulfato de Sódio) (Sigma-Aldrich) e, após centrifugação a 10.000 g por 40 min, 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 eletrotransferência molhada (35 mV) das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, por 15 h a 4 °C. A membrana foi bloqueada com 5% BSA diluído em solução PBS-TWEEN, por 1 h, à temperatura ambiente (TA), e incubada com o anticorpo primário anti-GHRH (Tabela 2) diluído em solução de bloqueio, por 15 h à 4 °C. Após a remoção do excesso de anticorpo primário por lavagens em solução PBS-TWEEN, a membrana foi incubada com anticorpo secundário específico anti-coelho (Tabela 2), por 2 h a TA, diluído em solução de bloqueio. Após esse período, a membrana foi novamente lavada em PBS-TWEEN, seguindo-se a reação para detecção das bandas utilizando-se o kit de ECL (Bio-Rad). As membranas foram coradas com Ponceau para controle do conteúdo de proteína depositada nos poços (controle interno).

4.1.1.1.3 Expressão da proteína Early Growth Response 1 (EGR-1)

O EGR-1 é um fator transcricional cuja expressão é largamente mensurada para identificar neurônios que disparam em resposta a um determinado estímulo (NELSON; TRAINOR, 2007). Desta forma, para identificar as regiões hipotalâmicas responsivas ao lactato foi avaliada a expressão de EGR-1.

No dia do experimento, os ratos que se encontravam no início da fase escura do período, foram submetidos à injeção aguda de lactato 10 mM ou salina 0,9% (Controle). Após 90 min (NELSON; TRAINOR, 2007), os mesmos foram anestesiados com ketamina e xilazina (40 mg/ kg e 40 mg/ kg), perfundidos cardiacamente com salina, seguindo-se da perfusão com paraformaldeído (PFA) a 4 % diluído em tampão PBS (pH 7,4) a 4 ºC. Os encéfalos foram removidos imediatamente após a perfusão e fixação em sacarose, a localização da proteína EGR-1 foi detectada pela técnica de imunohistoquímica por meio da reação avidina-biotina-imunoperoxidase (Ab-5, Calbiochem).

Os cortes do encéfalo foram realizados no micrótono com a espessura de 30 µm e foram utilisados para a detecção imunohistoquímica de células que expressam EGR-1. As secções foram incubadas por até 72 h com anticorpo primario anti-EGR-1 diluído em PBS contendo 2% soro IgG e 0,3% triton X-100, à 4°C (Tabela 2).

As secções foram lavadas em PBS e incubadas à TA por 90 min com um anticorpo secundário biotinilado (anti-coelho IgG, 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA). As mesmas foram novamente incubadas durante 90 min com ABC 1:200 (complexo avidina-biotina Elite Kit, Vector Laboratories) à TA. Após lavagem em PBS, o produto da reação de peroxidase foi visualizado pelo método glicose oxidase (ITOH et al., 1979), utilizando a 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno e o metal níquel (SHAMMAH-LAGNADO; ALHEID; HEIMER, 1999). Após a última lavagem em PBS, os cortes foram montados em lâminas previamente submersas numa solução de gelatina alúmen-cromo. Em seguida, as mesmas foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol, transferidas para o xilol e cobertas com DPX (1,3-dietil-8-fenilxantina; Sigma-Aldrich).

Foram examinados os núcleos hipotalâmicos Arqueado (ARC) e Ventromedial do Hipotálamo (VMH), que apresentam neurônios secretores de GHRH, no Periventricular (PVH), que apresenta neurônios secretores de SST e Dorso Medial (DMH), relacionado à saciedade, para identificar células EGR-1 positivas.

Tabela 2 - Lista de anticorpos para Western Blotting e para reações Imunológicas.

Anticorpo	Diluição	Procedência
GH	1:500	NIH
GHRH	1:5000	ABCAM
SOMATOSTATINA	1:5000	ABCAM
EGR-1	1:1000	SANTA CRUZ
IGF-1	1:5000	SANTA CRUZ
Secundário COELHO	1:5000	VECTOR

4.1.1.2 Hipófise

A hipófise foi removida para análise do comprimento da cauda poli(A) do transcrito de GH (poliadenilação) pelo método RACE-PAT (rapid amplification of cDNA ends), após a amplificação do seu cDNA de acordo com o protocolo padronizado por Sallés et al., 1999 e modificado por Serrano-Nascimento et al., 2010. O RNA total foi extraído e tratado com excesso de óligo (dT) ligado a um oligonucleotídeo ancorador (5′-GCGAGCTCCGCGGCCGCGT12) e submetido à reação de transcrição reversa (RT). Três microlitros do produto da reação de RT foram misturados ao tampão contendo 25 pmol de cada primers (*Gh*: 5′- GAGTTCGAGCGTGCCTACATTC-3′ e o âncora: 5′-GCGAGCTCCGCGGCCGCG-T12), 1,25 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase e 5x Green

GoTaq Flexi Buffer Migration Pattern (Promega Corp., Madison, WI, EUA) para proceder com a reação de PCR. As condições de PCR foram previamente padronizadas em 5 min a 95 °C (desnaturação inicial); seguindo-se 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 68°C (anelamento), 1 min a 72 °C (extensão); e terminando com 7 min de extensão final a 66 °C. O produto amplificado do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,5% contendo brometo de etídeo.

O comprimento do amplicon foi estimado pela densitometria e comparado ao DNA *ladder* de 100 pares de bases (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) usando o ImageQuant TL v2005 software (Amershan Biosciences, Buckinghamshire, UK). O *smear* indica que fragmentos (amplicons) de diferentes pesos moleculares foram gerados, sendo a diferença entre eles referente ao comprimento da cauda poli(A) dos mesmos.

4.1.2 Camundongos Lit/ Lit (*knockout* para GHRHr)

Foram utilizados camundongos *Lit/ Lit* (~ 15 g) e C57BL-6J (selvagens: ~ 25 g) provenientes do biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e do ICB, respectivamente. Os camundongos *Lit/ Lit* apresentam mutação espontânea do receptor de GHRH e nanismo. Eles foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica sob condições padronizadas de temperatura ambiental (24 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 horas diárias), com água e alimentação sendo fornecidas *ad libitum* (Protocolo registrado no CEAU # 122, p. 25, book 03).

No dia do experimento, os camundongos selvagens e *Lit/ Lit* receberam uma única injeção ip de 10 mM (1,5 µmols) de lactato de sódio (Lac 10 mM) ou salina (0,9%) e foram eutanaziados após 30 min, na fase escura (escotofase) do ciclo, conforme os experimentos anteriores. O sangue coletado para avaliação da concentração sérica de GH e de outros hormônios hipofisários (ACTH, TSH, PRL e FSH), utilizando-se o kit MILIplex® MAP (Cat#RPTMAG-86K; Merck Millipore, MA, USA), específico para detecção de hormônios hipofisários de murinos, conforme as instruções do fabricante.

Em resumo, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 RPM (centrífuga Eppendorf 5804 R), por 15 min, para obtenção do soro. Amostras de 25 µL de soro foram incubadas com 25 µL de tampão e outros 25 µL da solução Bead (esferas magnéticas associadas aos anticorpos específicos diluídas em uma solução específica) na placa de leitura. A placa foi agitada *overnight*, a 4 ºC. Após três lavagens com solução de lavagem 1X, 50 µL de solução de detecção dos anticorpos foi adicionada, seguindo-se incubação por 2 h, à TA. Em seguida, a placa foi incubada com 50 µL de estreptavidina-ficoeritrina, por 30 min. Após

três novas lavagens, 100 µL de fluido *sheath* foram incorporados à reação e para a leitura da placa foi utilizado o equipamento Luminex 200™ (Biorad, Hercules, USA). O coeficiente de variação intra/ entre ensaios foi fornecido pelo fabricante. As concentrações séricas dos hormônios foram expressas em pg/ ml.

4.1.3 Camundongos *Knockout* para MCT1$^{+/-}$ (KO)

Utilizamos animais geneticamente modificados para transportadores de monocarboxilatos do tipo 1 com objetivo de identificarmos a importância deles na atividade do eixo somatotrófico em resposta aos protocolos utilizados.

4.1.3.1 Exercício físico

Camundongos selvagens e heterozigotos para MCT1$^{+/-}$ (LENGACHER et al., 2013) de 8 semanas de idade (Laboratório Janvier, França) foram mantidos em biotério, com ciclo claro/escuro de 12 /12 h (luzes acendem as 07:00, Zeitgerber – ZT 0), e temperatura (22 ± 2 °C) controlados. Foram fornecidas ração (Kliba Nafag standard diet #3336, Kaiseraugst, Suíça) e água *ad libitum.* O estudo utilizou 35 animais machos, sendo 17 animais selvagens e 18 $MCT_1^{+/-}$, conforme os grupos abaixo:

Grupo C – Controle: Animais selvagens não exercitados
Grupo E – Exercitados: Animais selvagens exercitados
Grupo KO – Controle Knockout: Animais $MCT_1^{+/-}$ não exercitados
Grupo KOE – Knockout Exercitados: Animais $MCT_1^{+/-}$ exercitados

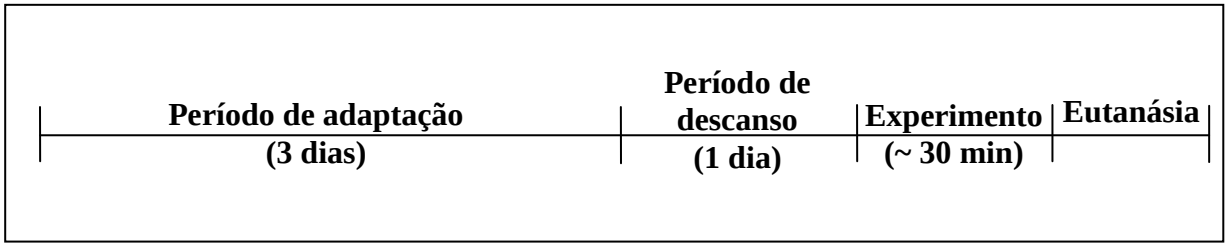
Todos os animais foram adaptados à esteira para roedores (Columbus Instruments, Columbus, EUA) durante 3 dias antes de iniciarmos o protocolo experimental de exercício, para minimizar o estresse causado pelo ambiente. Durante o período de adaptação, todos os animais foram familiarizados ao equipamento por 3-5 min, seguindo-se um gradativo aumento da velocidade da esteira até 10 m/ min. O equipamento possui uma grade elétrica na parte final da esteira, que por meio de estímulos (20 V, 0,34 mA e 2 Hz) garantia a manutenção dos animais em movimento.

Após a adaptação, foi adicionado um dia subsequente para descanso. No 5º dia, iniciou-se o protocolo experimental. Para tal, os animais foram mantidos na esteira sem movimento por 10 min. Logo após, a velocidade da esteira foi aumentada para 8,5 m/ min por 5 min. Em seguida, a velocidade da mesma foi incrementada progressivamente em 2.5 m/ min

a cada 3 min, atingindo a velocidade máxima de 40 m/ min. Durante todo o protocolo a inclinação foi mantida em 0º (figura 2).

Todo o experimento foi executado na fase escura do ciclo, nos ZT 13 – 15. Antes do experimento os critérios de exaustão foram determinados e estritamente seguidos. Desta forma, os animais seriam imediatamente removidos da esteira quando eles: (a) permanecerem por 10 s consecutivos na grade de estimulação elétrica; (2) passarem 50% do tempo na grade elétrica ou (c) não responderem ao estímulo manual.

Figura 2 – Protocolo experimental de exercício.



Protocolo adaptado de Masset and Berk, 2005; Gibb et al, 2016.

Antes e depois do protocolo de exercício, uma gota (25 µL) de sangue foi retirada da cauda dos animais para posterior determinação da concentração de lactato (Lactate Pro 2, Arkray, Japan) e glicose (FreeStyle Precision Neo, Abbott, UK). A intensidade do exercício era inferida pela lactatemia, que era proporcional à mesma. Logo após o término do protocolo de exercício, os animais foram eutanasiados por uma overdose de isoflurano e decapitados, e o sangue foi colhido do tronco, centrifugado a 3.500 RPM (centrífuga Eppendorf 5804 R) por 15 min, e o soro armazenado para dosagem da concentração de GH. O hipotálamo, a hipófise e o fígado foram coletados para quantificação das proteínas GHRH, SST, GH e IGF-1 e para avaliar a expressão gênica dos mesmos (Tabela 1), por técnicas de Western Blotting (WB) e PCR, respectivamente, como já fora supracitado. Todas as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à -80 °C para subsequentes análises.

A concentração sérica de GH foi determinada por kit de ELISA (Cloud-Immunoassay, Katy, TX, USA), conforme as instruções do fabricante.

4.1.3.2 Injeção de lactato de sódio

O objetivo desse estudo foi verificar se o eixo somatotrófico dos animais KO $MCT_1^{+/-}$ era responsivo à injeção de lactato. Neste estudo os animais receberam uma única injeção

intraperitoneal (ip) de lactato de sódio 10 mM (Sigma-Aldrich) ou salina (0,9%) (Controle), num volume de 150 µl no início da fase escura do ciclo, o que equivale à administração de 15 µmols de lactato de sódio (Sigma-Aldrich). Esses animais foram eutanasiados após 30 da injeção para remoção do hipotálamo, hipófise, fígado e sangue na escotofase (Salgueiro et al., 2014).

4.2 ESTUDOS *IN VITRO*

Para avaliarmos as ações diretas do lactato sobre os tecidos estudados, utilizamos culturas de células hipotalâmicas (Figura 3) e hipofisárias (Figura 4) tratadas com 10 mM de lactato de sódio.

4.2.1 Cultura primária de neurônios hipotalâmicos

Culturas primárias de neurônios hipotalâmicos de camundongos foram preparadas de acordo com o protocolo de BREWER et al. (1993) modificado (Figura 3). Para isso, os embriões de camundongos foram removidos da mãe no 17° dia da gestação, eutanasiados por decapitação e seus cérebros retirados da caixa craniana sob lupa. O hipotálamo foi extraído, colocado em uma solução contendo papaína, com finalidade de promover a digestão enzimática e mecanicamente dissociado com uma pipeta Pasteur. As células foram plaqueadas em lamínulas pré-tratadas com poli L-Lisina, o que permite melhor fixação das mesmas. A cultura foi mantida em meio neurobasal (Gibco) suplementado com o fator de crescimento B27 e glutamina.

Após o período de crescimento dos neurônios hipotalâmicos, identificamos a presença de células que expressam GHRH e SST na cultura, pela técnica de Imunocitoquímica. Para isso, as lamínulas contendo células hipotalâmicas foram fixadas e permeabilizadas em solução PFA 4% diluídos em PBS contendo Triton X-100, por 30 min. Após 3 lavagens de 10 min com PBS 1x, as células foram mantidas em meio contendo 0,05% de caseína em PBS-Tween, por 1 h, para evitar possíveis ligações inespecíficas. Em seguida, as mesmas foram incubadas *overnight* com anticorpo anti-GHRH (1: 500) ou anti-SST (1: 500) gerados em coelho e novamente lavadas com PBS por 3x de 10 min cada, seguindo-se uma incubação por 2 h a TA com anticorpo secundário FITC anti-coelho IgY (1: 500, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EUA). Depois de 3 lavagens com PBS 1x, as lamínulas foram marcadas com DAPI em meio de montagem VECTASHIELD (Vector Laboratories, EUA).

Todas as imagens foram sequencialmente adquiridas e processadas pelo microscópio de imunofluorescência (Nikon Eclipse 90i) utillizando o software NIS-Elements, com a objetiva de 60x, na resolução de 1024x768.

Figura 3 – Cultura de neurônios

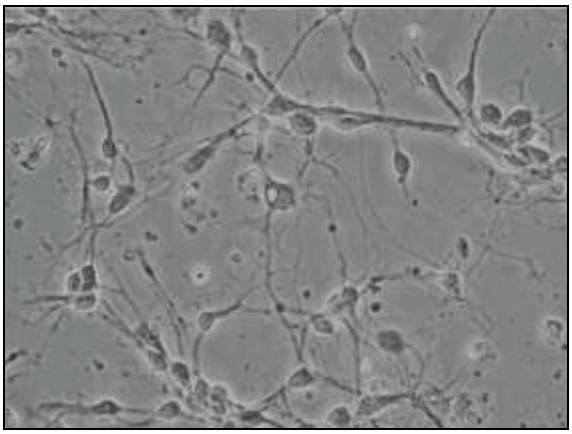


Imagem ilustrativa da cultura primária de neurônios hipotalâmicos de camundongos.

4.2.2 Células GH3

As células GH3 correspondem a uma linhagem proveniente de um adenoma hipofisário de rato que secreta GH e Prl (somatolactotrofos) (Figura 4). Elas foram cultivadas em meio RPMI com Hepes e bicarbonato de sódio, suplementado com L-glutamina 0,4 mM, piruvato de sódio 18 mM, β-mercaptoetanol 192,5 nM, 10% de soro fetal bovino, estreptomicina 100 mg/ml e penicilina 100 U/ml, sob uma atmosfera de 5% de CO_2 a uma temperatura de 37 °C, até atingirem a confluência de aproximadamente 80% (CORRÊA-DE-SANTANA et al., 2009). Os seguintes parâmetros foram avaliados:

4.2.2.1 Expressão gênica de *Gh* induzida pelo T3

Para validarmos nosso modelo, tratamos as células GH3 com T3 na concentração de 10^{-5} M, por 6h, uma vez que o T3 induz a transcrição do gene do GH (Diamond & Goodman, 1985), e avaliamos a expressão gênica do *Gh* por RT-PCR, conforme descrito anteriormente. Tendo sido constatada uma resposta positiva, continuamos os nossos estudos.

4.2.2.2 Expressão gênica e proteica de GH em reposta ao lactato

Aproximadamente 3 h antes do experimento, o meio de cultura contendo piruvato foi substituído por outro sem piruvato, uma vez que o mesmo pode influenciar na dinâmica do experimento com lactato. Após 3 h sem piruvato, foi adicionado lactato em alguns poços na concentração de 10 mM, por 30 min (grupo **Lac10 mM**).

Ao término do tratamento, o meio de cultura foi coletado para avaliação da expressão proteica de GH (WB: tabela 2) e as células para avaliação da expressão gênica (PCR: Tabela 1) e proteica (WB) deste hormônio, conforme descrito anteriormente.

4.2.2.3 Expressão gênica dos transportadores de lactato (*Mct* $_{1,\ 2,\ 3,\ 4}$) e do seu receptor (*Gpcr*$_{81}$).

Avaliamos também nas células GH3 a expressão gênica dos transportadores *Mct*$_1$, *Mct*$_2$, *Mct*$_3$, *Mct*$_4$ e do receptor de lactato *Gpcr*$_{81}$, por qPCR (Tabela 1), para explorarmos os possíveis mecanismos de ação do lactato.

4.2.2.4 Expressão gênica de *Gh* em resposta ao tratamento com lactato após tratamento com ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHC) e Actnomicina D (Act D)

Após os experimentos de identificação da expressão dos transportadores de lactato e de seu receptor nas células GH3, novas células foram geradas para realização de experimentos utilizando-se lactato de sódio após o tratamento com o CHC, que bloqueia os MCTs e, consequentemente, o fluxo de lactato, ou com Act D, inibidor da transcrição gênica.

Nesses experimentos, assim como nos anteriores, os meios de cultura contendo piruvato foram substituídos por outros sem piruvato (por 3 h). Em seguida, foram adicionados 10 mM de CHC ou 1 µM de Act D em parte dos poços da placa de cultura, deixando-os sob incubação por 1h30 antes da coleta das células. Nos ultimos 30 min de experimento, as células que receberam tratamento com CHC ou Act D e parte das que não receberam esses tratamentos foram tratadas com 10 mM de lactato, constituindo assim, os grupos **CHC+ Lac, Act D +Lac e Lac**. O grupo controle (**C**) foi constituído de células GH3 mantidas em meio sem piruvato e que não receberam quaisquer tratamentos.

4.2.2.5 Concentração de cálcio intracelular.

Para avaliarmos a concentração de cálcio intracelular foi utilizada microscopia de fluorescência. As células GH3 foram plaqueadas em *coverslips* de 25 mm previamente tratadas com poli-L-lisina, permanecendo por 2 a 3 dias na incubadora. Logo após, as células foram incubadas com solução Krebs-Ringer (KR) (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, HEPES 10 mM e glicose 10 mM) somado a 2,5 µM de Fura 2-AM, o qual marca o cálcio e intensifica o sinal captado pelo equipamento, por 1 h. As lamínulas foram lavadas com meio KR e montadas no microscópio invertido Observer-D1 (Carl Zeiss)

acoplado a uma câmera ORCA-ER (Hamamatsu Photonics) e a um trocador de comprimento de onda Lambda DG-4 (Sutter).

Assim, iniciou-se a gravação 3 minutos antes do experimento sem nenhum tipo de estímulo para aferirmos o estado basal celular (controle), em seguida adicionamos 10 mM de lactato de sódio por mais 3 min. Seguiu-se com a avaliação da viabilidade e responsividade celular a uma solução contendo 1 μM Bay K 8644 (Tocris), agonista de canais de cálcio do tipo L dependente de voltagem, e a uma solução contendo 25 mM KCl, concentração de potássio suficiente para despolarizar as mesmas. Logo após o experimento, selecionamos as células responsivas ao KCl ou ao Bay K e que eram responsivas ao lactato.

Ainda, realizamos um segundo experimento muito semelhante ao anterior, contudo todas as soluções utilizadas neste novo protocolo não continham $CaCl_2$ na composição, até que o adicionamos propositalmente para realização do ultimo estímulo, que serviu de controle positivo. Este experimento tinha como objetivo avaliar a origem do aumento intracelular de cálcio causado pela incubação com lactato, e verificar se era proveniente do meio extracelular ou de outros compartimentos intracelulares, como o retículo endoplasmático liso ou mitocondrial.

A análise das imagens foi realizada pelo software Metafluor (Molecular Devices). Os experimentos foram realizados utilizando-se uma objetiva com aumento de 40 x em óleo de imersão, enquanto as células foram expostas a uma alternância de feixes de luz com comprimento de onda entre 340 e 380 nm e foi medida a intensidade da emissão de luz em 520 nm. Alterações na concentração intracelular de cálcio foram mensuradas pela razão entre a intensidade de fluorescência F_{340}/F_{380}.

Figura 4 – Cultura de células GH3 (somatolactotrofos)

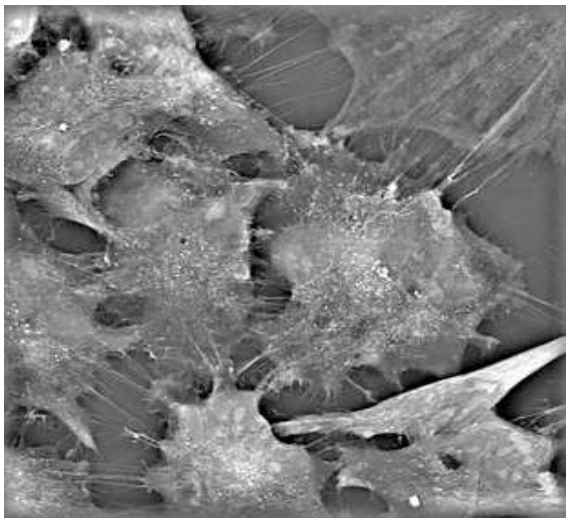


Imagem ilustrativa da cultura celular de somatolactotrofos (GH3) e sua organização em 3D (NANOLIVE).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados pelo teste *One-way* ou *Two-way ANOVA*, seguido por análise pós-teste de *Bonferroni*, ou pelo *Test-T* de *Student* (quando apropriado). Todas as diferenças foram consideradas significativas para valores de $p<0,05$.

6 RESULTADOS

Após demonstrarmos que o lactato estimula o eixo somatotrófico de ratos, procuramos explorar os mecanismos envolvidos nesse efeito, centrando nossos estudos no tecido hipotalâmico e hipofisário, utilizando diferentes estratégias em modelos *in vivo e in vitro.*

6.1 ESTUDOS *IN VIVO*

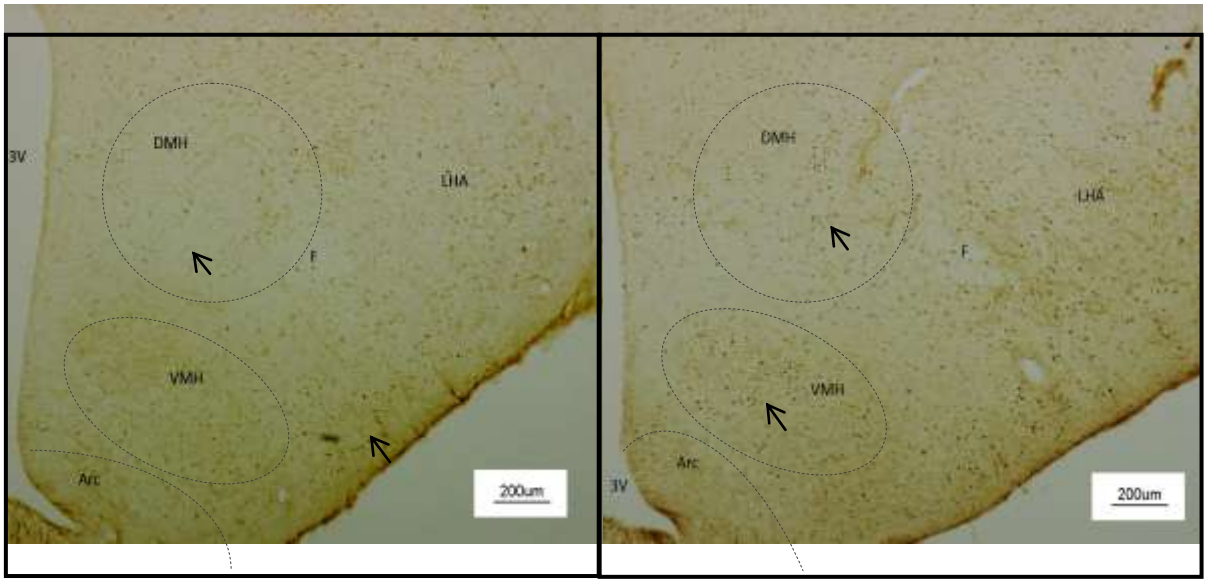
Nesses estudos avaliamos o efeito do tratamento com lactato em ratos, bem como em camundongos geneticamente modificados.

A figura 5 ilustra a expressão de EGR-1 (setas) nas células neurais hipotalâmicas em resposta a injeção ip de 10 mM de lactato, após 90 min da mesma, tempo em que ocorre sua maior expressão, segundo dados da literatura (NELSON; TRAINOR, 2007). Nota-se a expressão basal de EGR-1 após a injeção de salina (Controle), e o aumento acentuado da mesma em diversas regiões hipotalâmicas [núcleo arqueado (Arc), ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH), periventricular (PVH) e área hipotalâmica lateral (LHA)] após injeção de lactato.

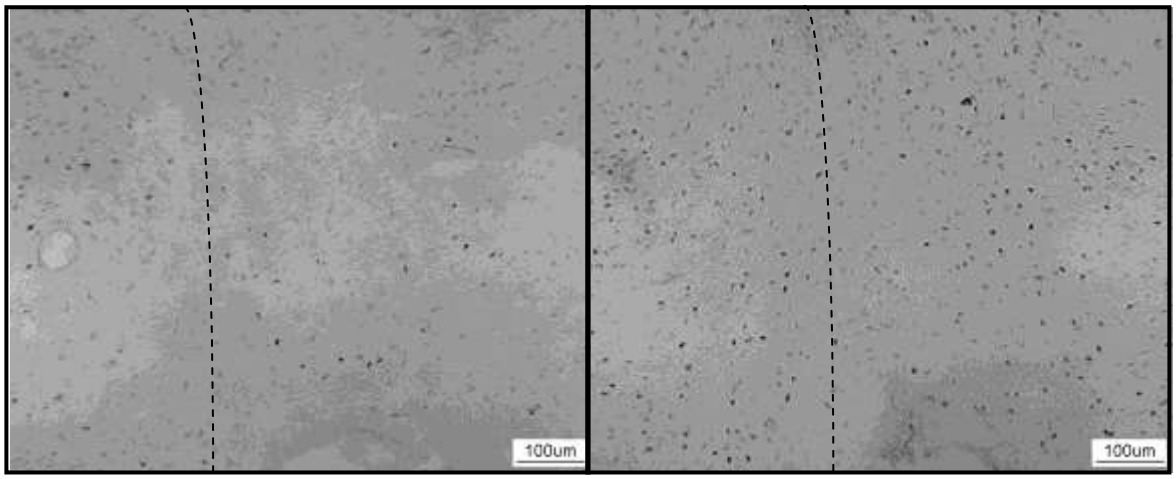
Figura 5 - Efeito da injeção de lactato sobre expressão proteica de EGR-1 hipotalâmico de rato.

Controle (salina) Lactato 10 mM

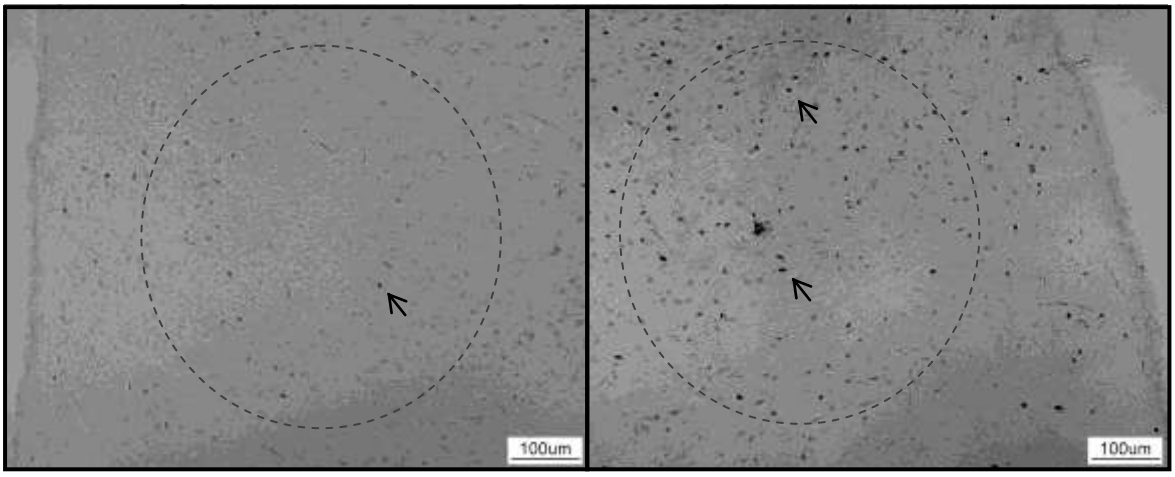
A) HIPOTÁLAMO



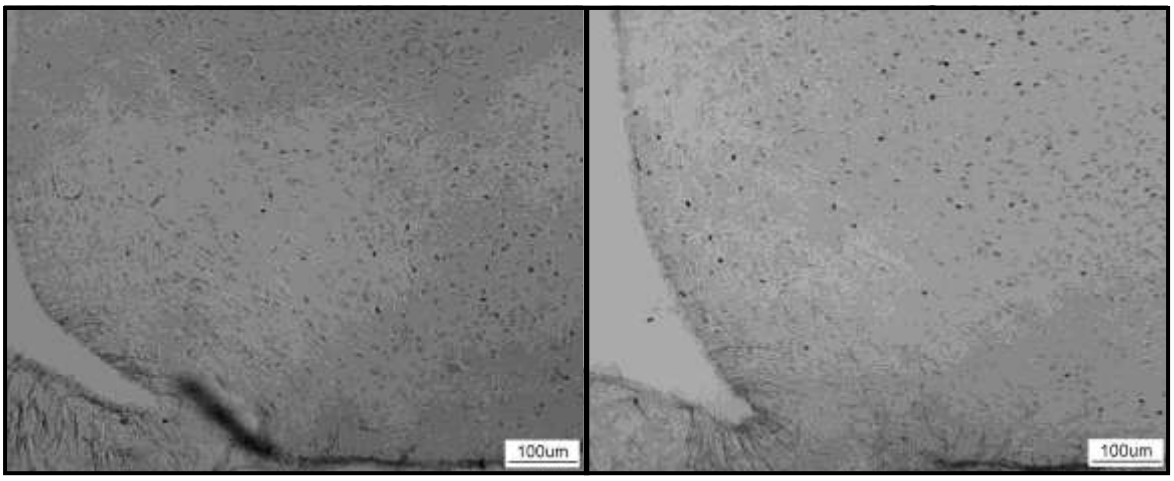
B) Periventricular (PE)



C) Dorsomedial (DMH)



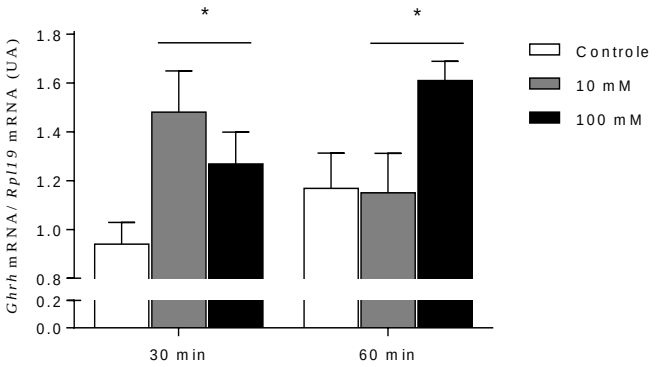
D) Arqueado (ARC) e Ventromedial (VMH)



Imunohistoquímica para EGR-1: **A)** no hipotálamo. **B)** no PVH. **C)** no DMH e **D)** no ARC e VMH. Abreviações - PVH: Núcleo Periventricular do Hipotálamo; F: Fórnix; VMH: Núcleo Ventromedial do Hipotálamo; Arc: Núcleo Arqueado; DMH: Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo; LHA: Área Lateral do Hipotálamo. Barra de escala 100µM (4x) e 200 µM (10x).

Seguiu-se com a expressão do mRNA de *Ghrh* hipotalâmico após 30 e 60 min da injeção ip de 10 ou 100 mM de lactato (figura 6). Pode-se observar que após 30 min da mesma ocorre aumento dessa expressão nos animais tratados com 10 e 100 mM de lactato *vs* grupo controle. Na aferição seguinte (60 min da injeção) a elevação da expressão gênica do *Ghrh* somente foi observada na maior dose do tratamento com lactato.

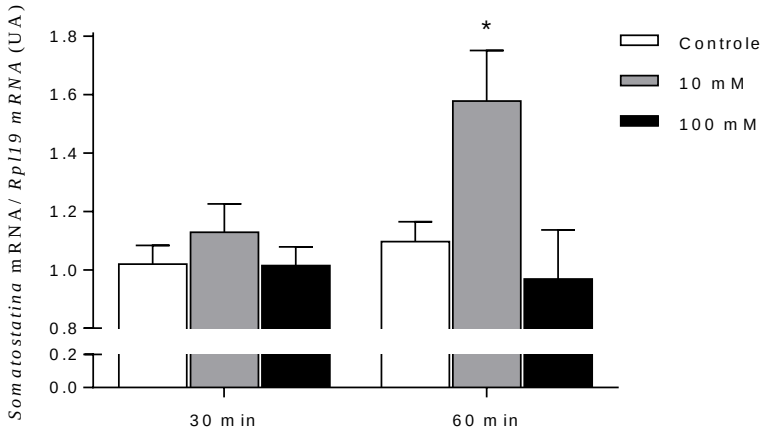
Figura 6 - Efeito da injeção de lactato sobre expressão gênica de *Ghrh* hipotalâmico de ratos.



Expressão gênica de *Ghrh* hipotalâmico. Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA da *Rpl19* (constitutiva) e expressos como média ± erro padrão da média (SEM), em Unidades Arbitrárias (UA). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. * $p<0,05$ fator tratamento *vs.* Controle, seguida da análise de Bonferroni como pós-teste. *n* = 6-10 animais/grupo/tempo.

Quanto à somatostatina hipotalâmica (Figura 7), observamos aumento da sua expressão gênica após 60 min do tratamento com 10 mM de lactato (* $p<0,05$). Para todos os outros tempos e doses não houve variação significativa ($p>0,05$).

Figura 7 - Efeito da injeção de lactato sobre a expressão gênica de *Sst* hipotalâmica de ratos.

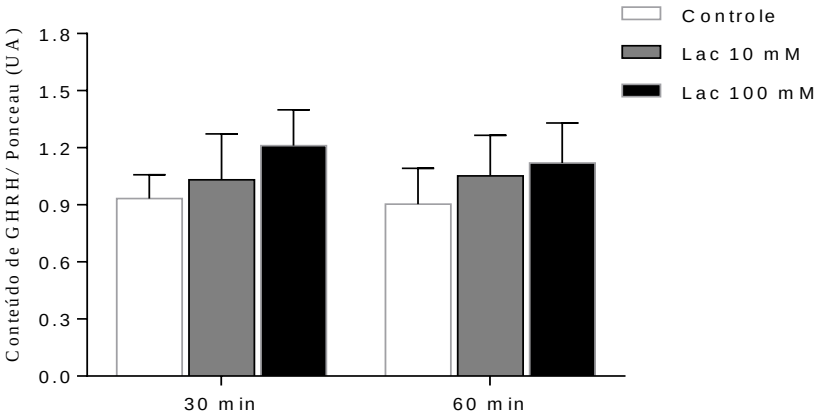


Expressão gênica de *Sst* hipotalâmica. Os valores foram normalizados pela expressão do mRNA da *Rpl19* (constitutiva) e expressos como média ± erro padrão da média (SEM), em Unidades Arbitrárias (UA). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. * p<0,05 *vs*. Controle 60 min. *n* = 6-10 animais/grupo/tempo.

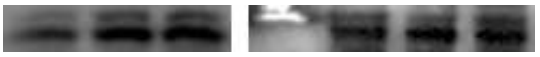
Já, o conteúdo de GHRH não foi alterado significativamente pelo tratamento com lactato em nenhum dos tempos e doses utilizados (figura 8).

Figura 8 - Efeito da injeção de lactato sobre o conteúdo de GHRH hipotalâmico de ratos.

A)

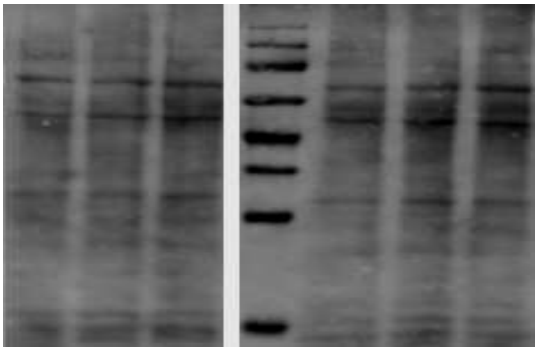


B)



GHRH

C)



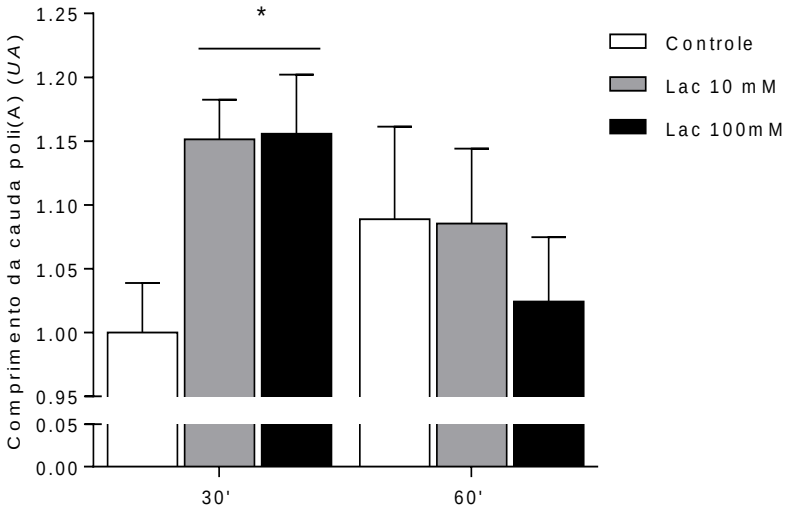
Ponceau

A) Conteúdo de GHRH normalizado pelo Ponceau. Os valores foram normalizados pelo Ponceau e expressos como média ± erro padrão da média (SEM), em Unidades Arbitrárias (UA). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. p>0,05. *n* = 7 por grupo. **B)** Imagem do blot representativa da expressão de GHRH. **C)** Imagem da coloração das membranas com Ponceau.

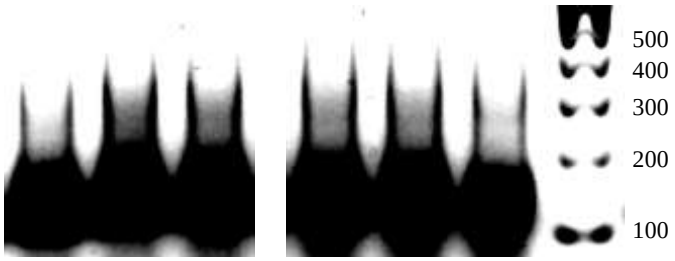
Quanto aos estudos realizados na hipófise de ratos, observa-se que, após os primeiros 30 min, as duas doses de lactato utilizadas foram efetivas em aumentar o grau de adenilação da cauda poli(A) do mRNA de *Gh*, quando comparadas com ratos tratados com salina (controle). Aos 60 min de tratamento, não foram notadas alterações significativas em ambas às doses (Figura 9).

Figura 9 - Efeito da injeção de lactato sobre o comprimento da cauda poli(A) do mRNA de *Gh* de ratos.

A)



B)



A) Comprimento da cauda poli(A). Os valores foram apresentados em unidades arbitrárias (UA) e expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. **B)** Imagem ilustrativa do comprimento da cauda poli(A) do transcrito de *Gh* após eletroforese em gel de agarose.

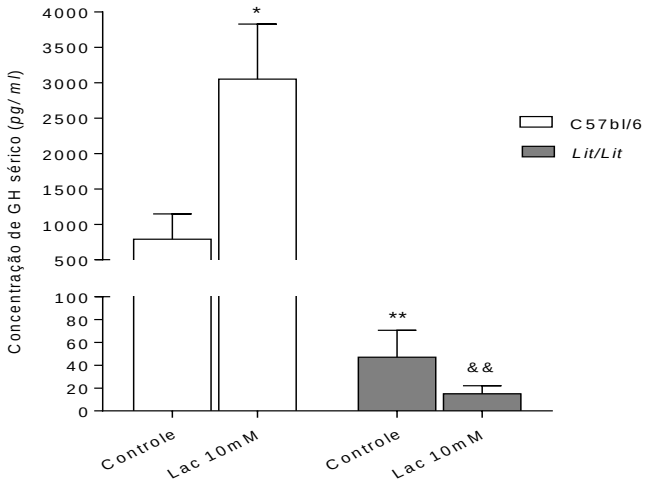
A figura 10 (A, B, C, D, E) ilustra o experimento realizado com os camundongos Lit/Lit e selvagens nos quais avaliamos a concentração sérica de GH, ACTH, FSH, TSH e

PRL, respectivamente, após 30 min da injeção ip de 10 mM (1,5 µmols) de lactato. Pode-se observar que não ocorreram alterações significativas na concentração de ACTH, FSH e PRL.

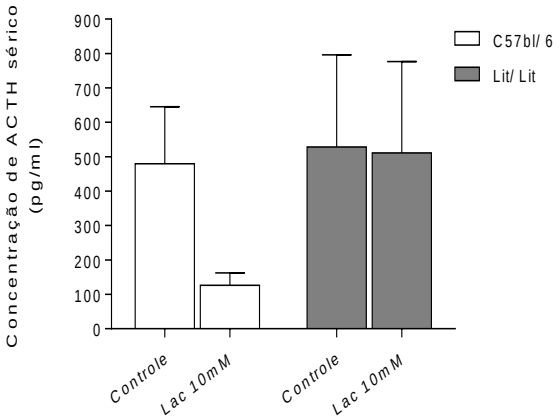
Quanto ao TSH circulante, o tratamento com lactato aumentou a concentração desse hormônio nos camundongos selvagens e *Lit/ Lit*, quando comparado aos seus respectivos grupos controle (salina) ($^{\#\#}$ p<0,005). Quanto à concentração de GH sérico, observou-se elevação (5x) da mesma somente nos animais selvagens tratados com lactato (* p<0,05). Os animais *Lit/ Lit*, cujo gene do receptor do GHRH apresenta uma mutação inativadora, apresentaram concentração de GH sérico significativamente inferior (10x) à dos animais selvagens controles (** p<0,005), e o seu tratamento com lactato reduziu esse parâmetro à metade do valor do grupo controle *Lit/ Lit* ($^{\&\&}$ p<0,005).

Figura 10 - Efeito da injeção ip de lactato (1,5 µmols) sobre a concentração sérica de GH, ACTH, FSH, TSH e PRL de camundongos selvagens e *Lit/ Lit*.

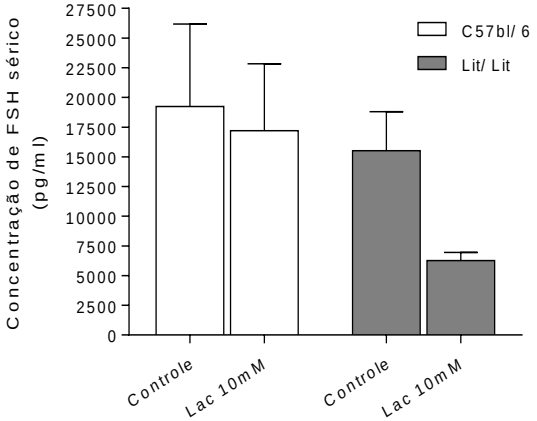
A) GH



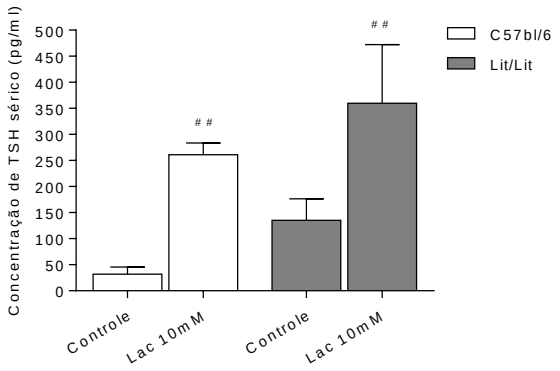
B) ACTH



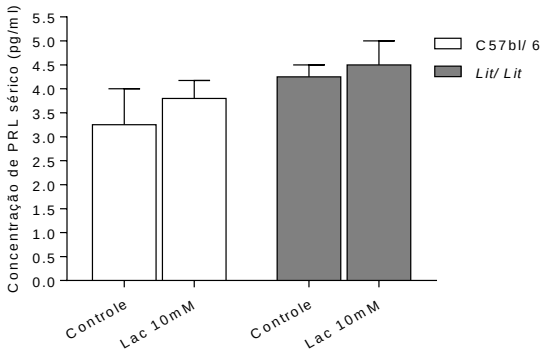
C) FSH



D) TSH



E) PRL

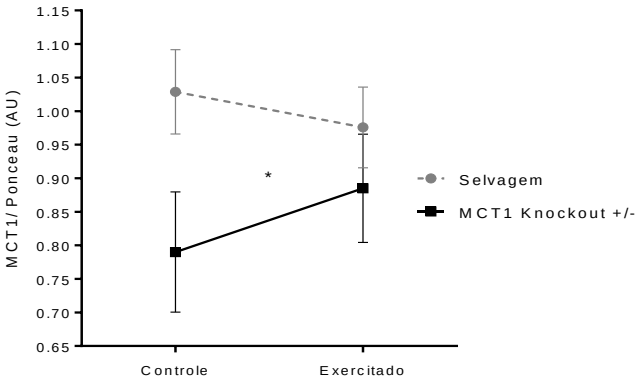


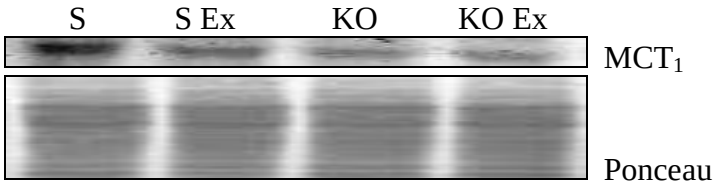
A) Concentração de GH sérico: * p<0,05 e ** p<0,01 *vs.* Controle (selvagem); $^{\&\&}$ p<0,01 *vs.* Controle *Lit/Lit.* **B)** Concentração de ACTH sérico: p>0,05. **C)** Concentração de FSH sérico: p>0,05. **D)** Concentração de TSH sérico: $^{\#\#}$ p<0,01 *vs.* Controle. **E)** Concentração de PRL sérica (p>0,05). Os valores estão apresentados como média de pg/ ml ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. N = 5 por grupo.

Nos experimentos em que avaliamos a importância do MCT_1 sobre a atividade do eixo somatotrófico, inicialmente analisamos a expressão do MCT_1 nos diferentes componentes do mesmo. Observamos uma menor expressão desse transportador no hipotálamo, hipófise e fígado nos animais KO $MCT_1^{+/-}$ em relação aos animais selvagens, sendo eles exercitados ou não (Figura 11A, B e C).

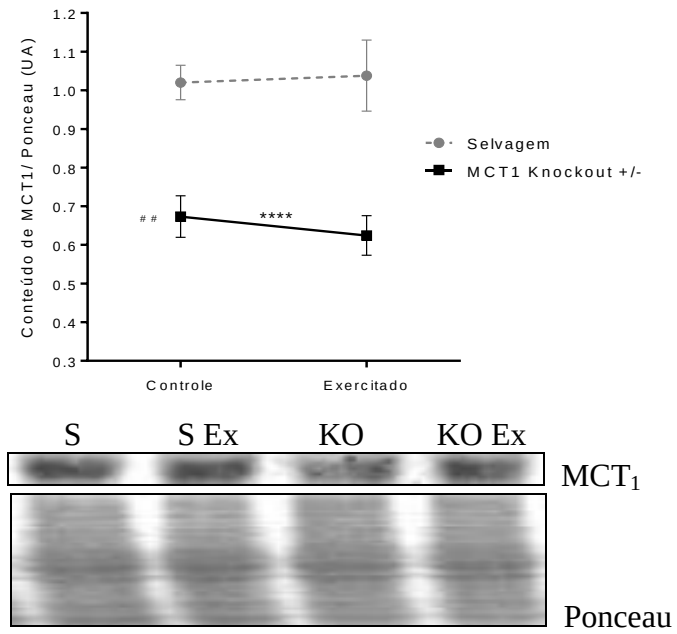
Figura 11 – Efeito do exercício físico agudo sobre expressão de MCT_1 no hipotalâmico, hipófise e fígado de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.

A) Hipotálamo

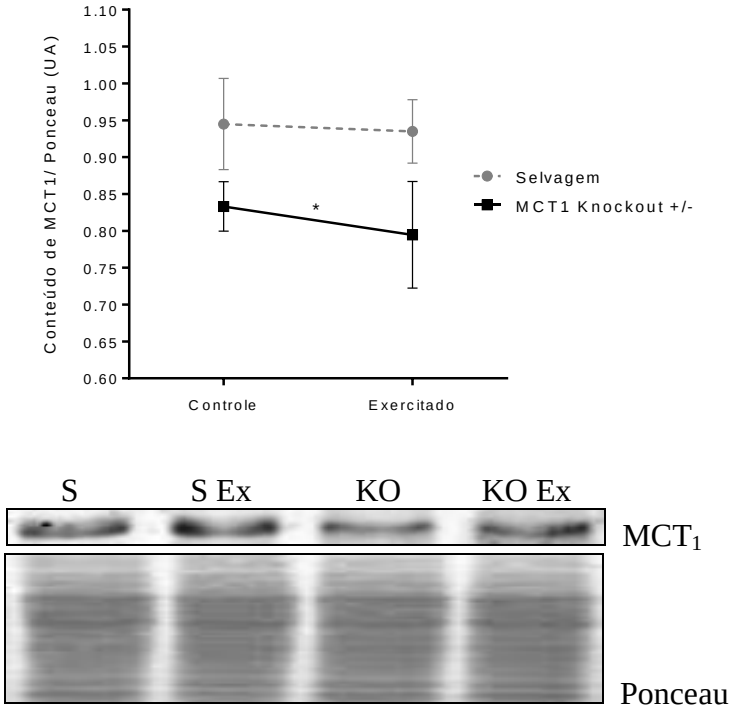




B) Hipófise



C) Fígado



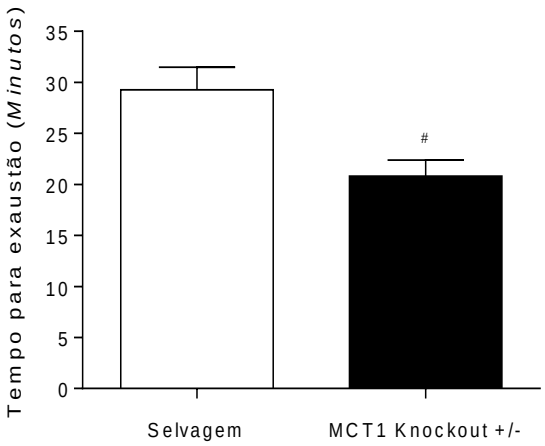
A) Painel superior: Conteúdo de MCT_1 hipotalâmico normalizado pelo Ponceau. Painel Central: Imagem do blot representativa da expressão de MCT_1. Painel inferior: Imagem da coloração das membranas com Ponceau. * p<0,05 *vs.* Selvagens. **B)** Painel superior: Conteúdo de MCT_1 hipofisário normalizado pelo Ponceau. No meio: Imagem do blot representativa da expressão de MCT_1. Painel inferior: Imagem da coloração das membranas com Ponceau. **** p<0,001 *vs.* Selvagens; ## p<0,005 *vs.* S. **C)** Painel superior: Conteúdo de MCT_1 hepático normalizado pelo Ponceau. Painel Central: Imagem do blot representativa da expressão de MCT_1. Painel inferior: Imagem da coloração das membranas com Ponceau. * p<0,05 *vs.* Selvagens. Os valores foram apresentados em unidades arbitrárias (UA) e expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. (S: n = 10; S Ex: n = 8; KO: n = 13; KO Ex: n = 7).

A avaliação funcional desses animais KO $MCT_1^{+/-}$ frente a uma única sessão de exercício até exaustão não mostrou diferença qualitativa sobre o padrão de movimento entre eles e os selvagens. Contudo pudemos observar que, quantitativamente, os animais KO $MCT_1^{+/-}$ atingiram o estado de fadiga em menor tempo que animais selvagens (Figura 12A), atingindo a exaustão aproximadamente 10 minutos antes do grupo controle.

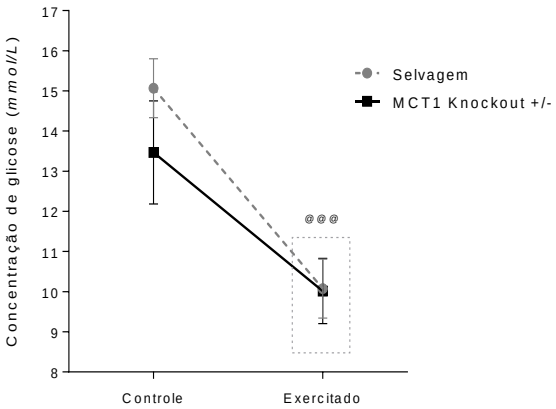
Antes e após o período de exercício, coletamos uma gota de sangue da cauda de todos os animais e quantificamos a concentração de glicose e de lactato. Ambos os grupos exercitados apresentaram diminuição da concentração de glicose na corrente sanguínea, sendo que ambos possuíam concentrações basais estatisticamente semelhantes (Figura 12B). Já a lactatemia em resposta ao protocolo de exercício se apresentou 2 vezes maior que a basal para ambos os grupos desafiados (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do exercício físico em parâmetros funcionais e metabólicos de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.

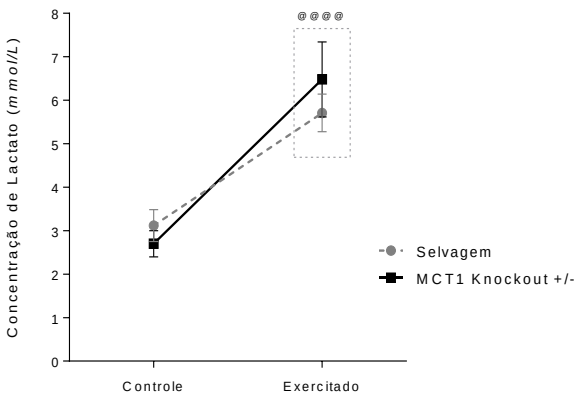
A) Duração



B) Glicemia



C) Lactacidemia



A) Tempo de exercício físico dos animais até exaustão (min), $^{\#}$ p<0,05 *vs.* animais selvagens (S). Os valores foram apresentados em minutos e expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *Test-T.* (N= 12/grupo). **B)** Concentração de glicose, $^{@@@}$ p<0,01 *vs.* Controles. **C)** Concentração de lactato, $^{@@@@}$ p<0,001 *vs.* Controles. Os valores foram apresentados em mmol/L e expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste (S: n = 6; S Ex: n = 12; KO: n = 6; KO Ex: n = 7).

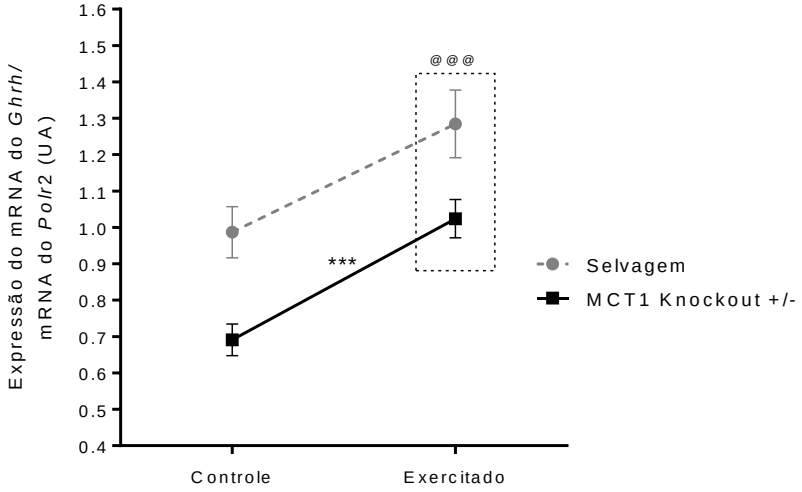
Na figura 13 apresentamos a expressão de peptídeos hipotalâmicos relacionados ao eixo somatotrófico na mesma condição anterior. Nota-se que a expressão basal do mRNA de *Ghrh* dos camundongos $MCT_1^{+/-}$ é menor do que nos camundongos selvagens ($^{@@@}$ p<0,01 *vs.* Selvagens) e após o exercício físico ambos os grupos aumentaram a expressão desse gene na mesma magnitude (*** p< 0,01 *vs.* Controles) (Figura 13A). A situação se repete para a expressão proteica de GHRH (Figura 13B). Vale ainda notar que a injeção de lactato não exerce nenhum efeito significativo sobre a expressão da proteína de GHRH de animais que têm ausência parcial do MCT_1 (Figura 13B).

A figura 13C mostra que a expressão basal de *Sst* é diferente em ambos os grupos, sendo ela maior nos animais selvagens ($^{\#\#\#\#}$ p<0,001 *vs.* Selvagens). Do mesmo modo, após o protocolo de exercício, os grupos apresentam respostas distintas ($^{\&}$ p<0,05 interação), ou seja, a expressão de *Sst* do grupo selvagem se manteve semelhante à expressão basal e a dos camundongos $MCT_1^{+/-}$ se apresentou tendenciosamente a aumentar (Figura 13C) (**** p<0,001 *vs.* Selvagens). A mesma resposta aumentada também ocorre com expressão da proteína de SST, contudo a expressão basal de SST nos dois grupos é semelhante (Figura 13D). Ainda, podemos notar no mesmo gráfico que a expressão de SST nos animais KO que receberam uma injeção de lactato está aumentada em relação ao seu valor basal.

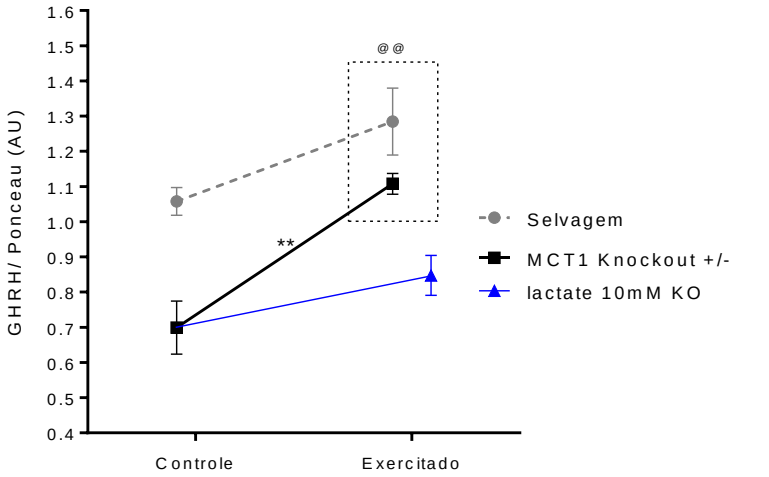
Ainda na figura 13E e F, podemos notar que o exercício aumenta a expressão do *Npy* (orexígeno) ($^{@}$ p<0,05 *vs.* Controles) e *Pomc* (anorexígeno) ($^{@@}$ p=0,01 *vs.* Controles) de ambas as linhagens desafiadas, contudo a expressão gênica de *Npy* nos animais selvagens é maior do que dos animais KO $MCT_1^{+/-}$ (* p<0,05 *vs.* Selvagens).

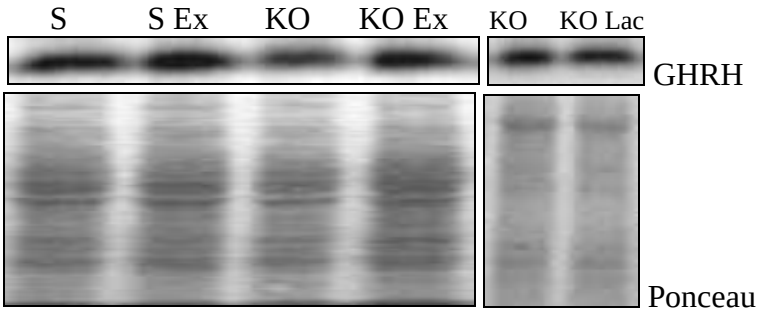
Figura 13 - Efeito do exercício físico sobre a expressão de genes e de proteínas hipotalâmicas de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.

A) ***Ghrh***

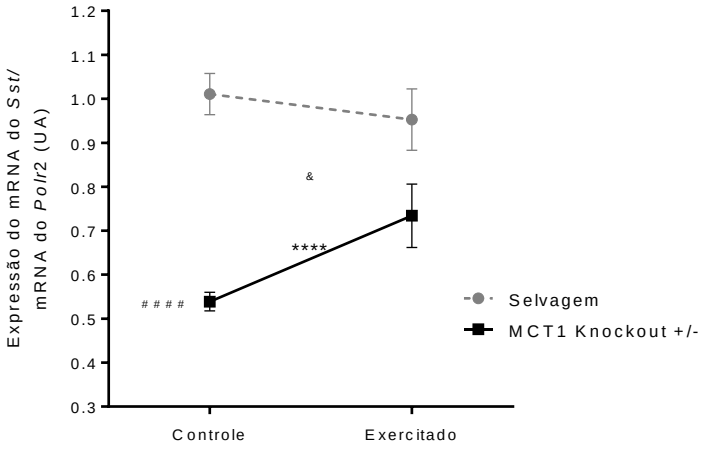

Expressão do mRNA do Ghrh/
mRNA do Polr2 (UA)
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
@@@
***
Controle
Exercitado
Selvagem
MCT1 Knockout +/-

B) GHRH

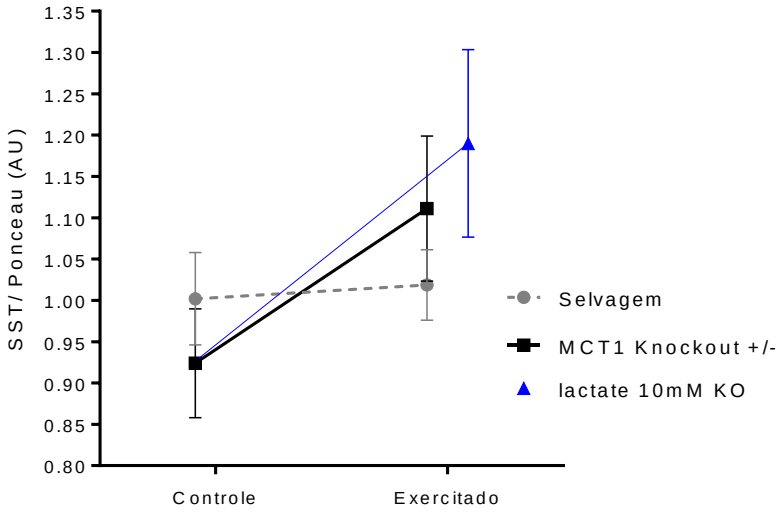

GHRH/ Ponceau (AU)
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
@@
**
Controle
Exercitado
Selvagem
MCT1 Knockout +/-
lactate 10mM KO

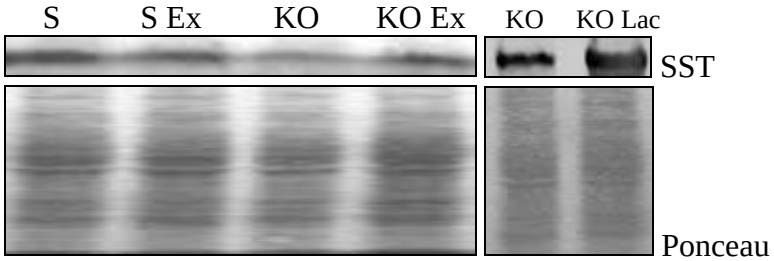

S
S Ex
KO
KO Ex
KO
KO Lac
GHRH
Ponceau

C) *Sst*

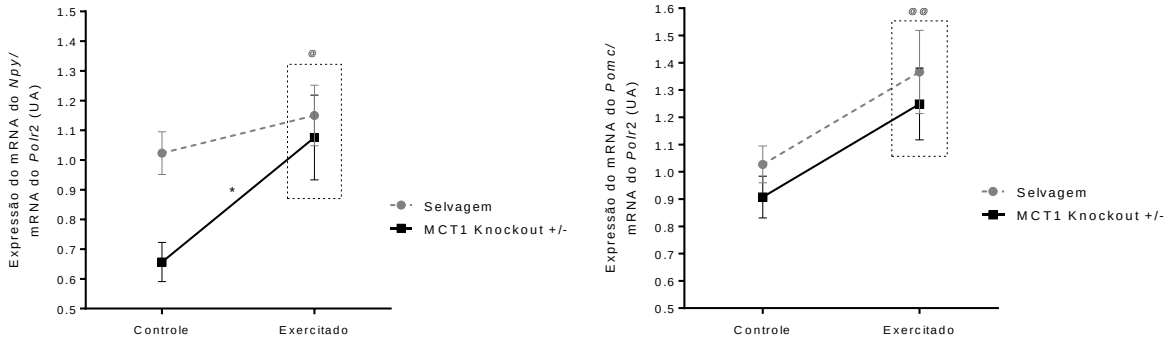

Expressão do mRNA do Sst/
mRNA do Polr2 (UA)
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
&
****
####
Selvagem
MCT1 Knockout +/-
Controle
Exercitado

D) SST


SST/ Ponceau (AU)
1.35
1.30
1.25
1.20
1.15
1.10
1.05
1.00
0.95
0.90
0.85
0.80
Selvagem
MCT1 Knockout +/-
lactate 10mM KO
Controle
Exercitado


S
S Ex
KO
KO Ex
KO
KO Lac
SST
Ponceau

E) ***Npy*** **F)** ***Pomc***



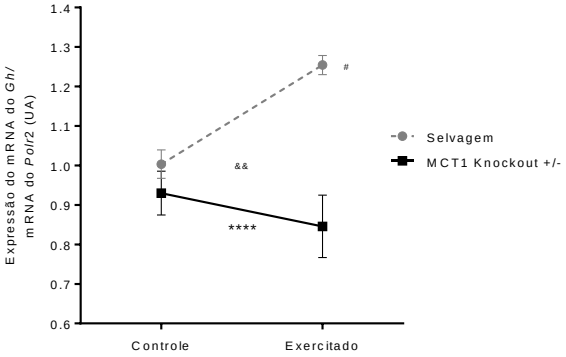
A) Expressão gênica de *Ghrh* normalizado pelo gene *Polr2*, $^{@@@}$ p<0,01 *vs.* Selvagens; *** p<0,01 *vs.* Controles. **B)** Painel superior: Conteúdo de GHRH normalizado pelo Ponceau. ** p=0,01 *vs.* Selvagens; $^{@@}$ p=0,01 *vs.* Controles. Painel Central: Imagem do blot representativa da expressão de GHRH. Painel inferior: Imagem da coloração das membranas com Ponceau. (Selvagem: n = 11; Selvagem Ex: n = 8; KO: n = 16; KO Ex: n = 5). **C)** Expressão gênica de *Sst* normalizado pelo gene *Polr2*, $^{\#\#\#\#}$ p<0,001 *vs.* S; **** p<0,001 *vs.* Selvagens; $^{\&}$ p<0,05 interação. **D)** Painel superior: Conteúdo de SST normalizado pelo Ponceau. Painel Central: Imagem do blot representativa da expressão de SST. Painel inferior: Imagem da coloração das membranas com Ponceau. (Selvagem: n = 10; Selvagem Ex: n = 8; KO: n = 13; KO Ex: n = 7). **E)** Expressão gênica de *Npy* normalizado pelo gene *Polr2*, $^{@}$ p<0,05 *vs.* Controles; * p<0,05 *vs.* Selvagens. **F)** Expressão gênica de *Pomc* normalizado pelo gene *Polr2*, $^{@@}$ p=0,01 *vs.* Controles. Os valores foram apresentados em unidade arbritária (UA) e expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste (Selvagem: n = 10; Selvagem Ex: n = 11; KO: n = 9; KO Ex: n = 7).

No tecido hipofisário, observamos que a expressão gênica basal do *Gh* dos camundongos KO $MCT_1^{+/-}$ é menor do que a dos animais selvagens e que ambos respondem de maneira diferente ao protocolo de exercício ($^{\&\&}$ p=0,01) (Figura 14A), já que nos animais selvagens a expressão desse parâmetro aumenta significativamente ($^{\#}$ p<0,05 *vs.* S), e nos animais KO $MCT_1^{+/-}$ ela se mantém.

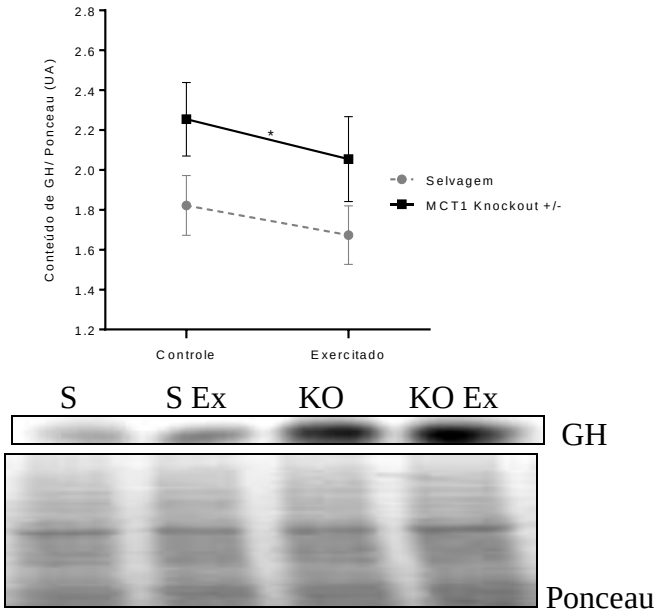
Quando analisamos a expressão de GH (Figura 14B), observamos que os animais KO $MCT_1^{+/-}$ possuem maior conteúdo dessa proteína quando comparado aos animais selvagens e o quadro se mantém após os animais serem exercitados.

Figura 14 - Efeito do exercício físico sobre a expressão de GH de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.

A) ***Gh***



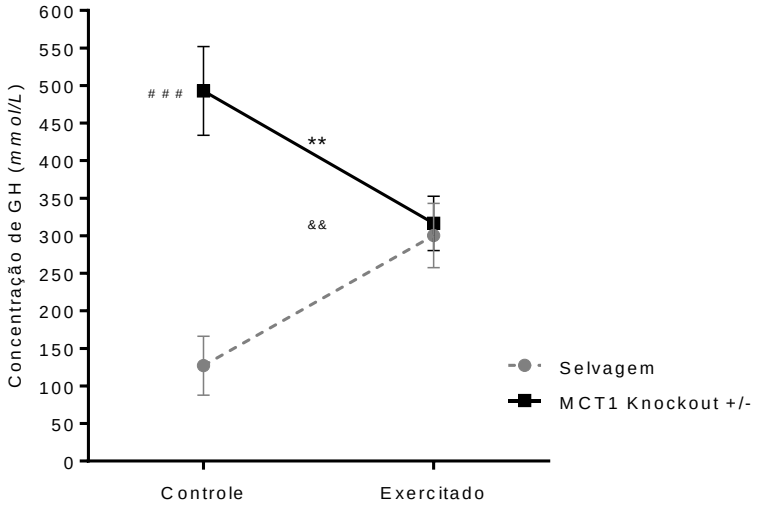
B) GH



A) Expressão gênica de *Gh* normalizado pelo gene *Polr2*. # p<0,05 *vs.* S; **** p<0,001 *vs.* Selvagens; && p=0,01 interação (Selvagem: n = 9; Selvagem Ex: n = 7; KO: n = 7; KO Ex: n = 7). **B)** Painel superior: Conteúdo de GH normalizado pelo Ponceau. * p<0,05 *vs.* Selvagens. Painel Central: Imagem do blot representativa da expressão de GH. Painel inferior: Imagem da coloração das membranas com Ponceau. Os valores foram apresentados em unidade arbritária (UA) e expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. (Selvagem: n= 4; S Ex: n= 9; KO: n= 8; KO Ex: n= 7).

O ponto seguinte do eixo somatotrófico analisado foi a concentração sérica de GH, a qual se encontra 5 vezes maior no grupo KO $MCT_1^{+/-}$ (### p<0,01 *vs*. S) *vs* camundongos do tipo selvagem. Contudo, ao final do protocolo de exercício, os camundongos do tipo selvagem apresentaram aumento da concentração sérica de GH, enquanto os KO $MCT_1^{+/-}$ redução da mesma, o que resultou em concentração de GH sérica similar nos dois grupos (&& p=0,01 interação) (Figura 15).

Figura 15 - Efeito do exercício físico sobre a concentração de GH no soro de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.

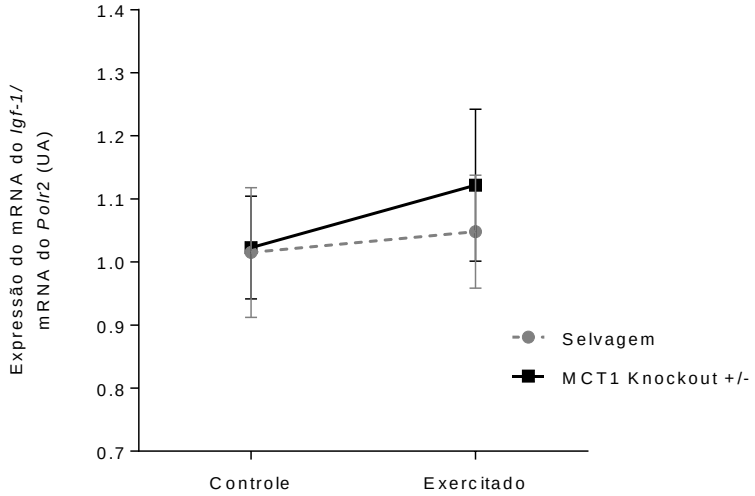


Concentração de GH no soro. ### p<0,01 *vs*. S; ** p=0,01 *vs*. Selvagens; && p=0,01 interação. Os valores foram apresentados em mmol/L e expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. (Selvagem: n = 6; Selvagem Ex: n = 12; KO: n = 6; KO Ex: n = 6).

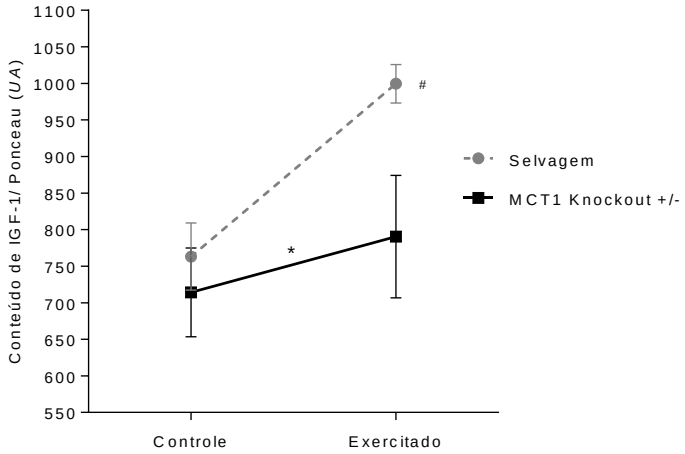
Por fim, analisamos o tecido hepático e notamos que a expressão do mRNA de *Igf*-1 não foi alterada em qualquer condição experimental estudada (Figura 16A). Quanto à proteína IGF-1, os animais geneticamente modificados apresentavam menor expressão quando comparados aos animais selvagens (* p<0,05 *vs*. selvagens). Após o exercício, apenas os animais selvagens apresentaram aumento do seu conteúdo (Figura 16B).

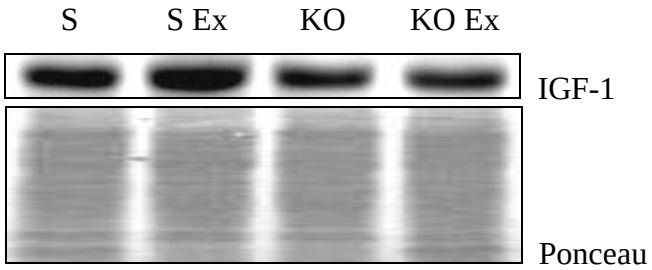
Figura 16 - Efeito do exercício físico sobre a expressão de IGF-1 hepático de camundongos selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$.

A) *Igf-1*



B) IGF-1





A) Expressão gênica de *Igf*-1. (Selvagem: n = 4; Selvagem Ex: n = 5; KO: n = 7; KO Ex: n = 6). **B)** Painel superior: Conteúdo de IGF-1 normalizado pelo Ponceau. * p<0,05 *vs.* Selvagens; # p<0,05 *vs.* Selvagens. Painel Central: Imagem do blot representativa da expressão de IGF-1. Painel inferior: Imagem da coloração das membranas com Ponceau. Os valores foram apresentados em unidade arbitária (UA) e expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Utilizou-se *ANOVA Two-way* e de Bonferroni como pós-teste. (Selvagem: n = 6; Selvagem Ex: n = 6; KO: n = 5; KO Ex: n = 5).

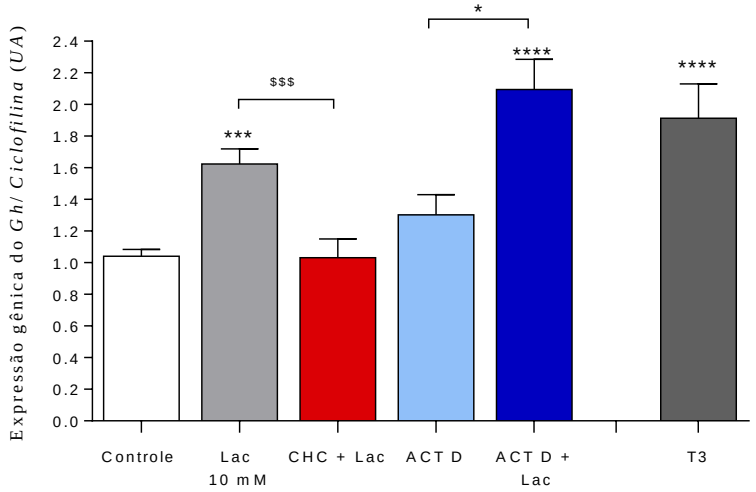
6.2 ESTUDOS *IN VITRO*

Para analisarmos o efeito do lactato bem como seu mecanismo de ação diretamente na hipófise e hipotálamo, utilizamos a linhagem celular GH3 e cultura primária de neurônios

hipotalâmicos, respectivamente, após realização de experimentos que demonstraram a viabilidade desses modelos. Assim avaliamos a expressão de GH frente à administração de T3, que sabidamente estimula os somatotrofos (células GH3) a sintetizarem GH (figura 17) (SILVA et al., 2009), e de GHRH e SST frente à administração de grelina, que também estimula a expressão de ambos (figura 22).

Na figura 17 observamos que a expressão gênica de *Gh* das células GH3 tratadas com 10 mM de lactato, por 30 min, apresentou um aumento de 60 % em relação ao grupo controle (*** p<0,001 *vs.* Controle). O tratamento prévio das células GH3 com o CHC (10 mM), inibidor dos MCTs, impediu que o efeito do lactato se manifestasse. O tratamento com Act D, inibidor da transcrição gênica, não alterou a expressão gênica das células GH3, diferentemente do efeito positivo observado frente ao estímulo dessas células com Lac 10 mM (**** p<0,0001 *vs.* Controle).

Figura 17 - Efeito do lactato e da inibição do seu transportador sobre a expressão gênica de *Gh* em células GH3.

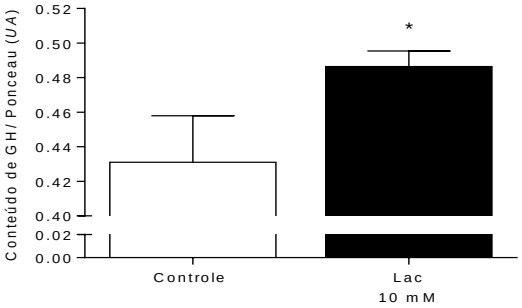


Expressão gênica de *Gh* de células tratadas com 10 mM de lactato, com 10 mM de CHC (I) + 10 mM de lactato, Act D, Act D + 10 mM de lactato e com T3 (controle positivo). Os valores foram normalizados pela expressão mRNA da *Ciclofilina* e expressos como média ± erro padrão da média (SEM), em Unidades Arbitrárias (UA). Análise em *One Way Anova* e usando Bonferroni como pós-teste. *** p<0,001 *vs.* Controle; $$$ p<0,001 *vs.* Lac 10 mM; **** p<0,0001 *vs.* Controle; * p<0,05 *vs.* ACT D. *n* = 4 – 6 por grupo de experimentos em triplicata.

Adicionalmente, avaliamos o efeito do lactato na concentração de 10 mM na expressão de GH nesta linhagem celular. Podemos verificar na figura 18 que após 30 min do tratamento com lactato ocorre um aumento significativo da expressão de GH (p<0,05).

Figura 18 - Efeito do lactato sobre o conteúdo de GH de células GH3.

A)



B)

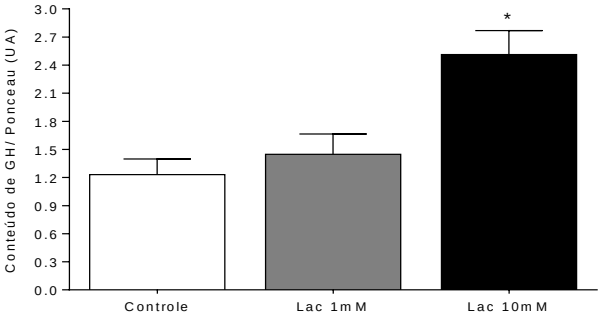
C)

A) Conteúdo de GH por 30 min com 10 mM de lactato normalizados pelo Ponceau e expressos como média ± erro padrão da média (SEM), em Unidades Arbitrárias (UA). Análise em *Test T*. * p<0,05 *vs* Controle. *n* = 4 por grupo de experimentos em triplicata. **B)** Imagem do blot representativa da expressão de GH. **C)** Imagem da coloração das membranas com Ponceau.

Avaliamos também o conteúdo de GH no meio de cultura logo após 30 min do tratamento com lactato nessas mesmas células e observamos aumento significativo do mesmo apenas quando as células GH3 foram tratadas com 10 mM de lactato. Nesta dose, o aumento representa aproximadamente o dobro da quantidade dosada no meio de cultura das células controle (p<0,05). Realizamos adicionalmente um experimento similar com a utilização de 1 mM de lactato, a qual não modificou o conteúdo de GH no meio de cultura *vs* controle (p>0,05) (figura 19).

Figura 19 - Efeito do lactato sobre o conteúdo de GH no meio de cultura de células GH3.

A)



B)

C)

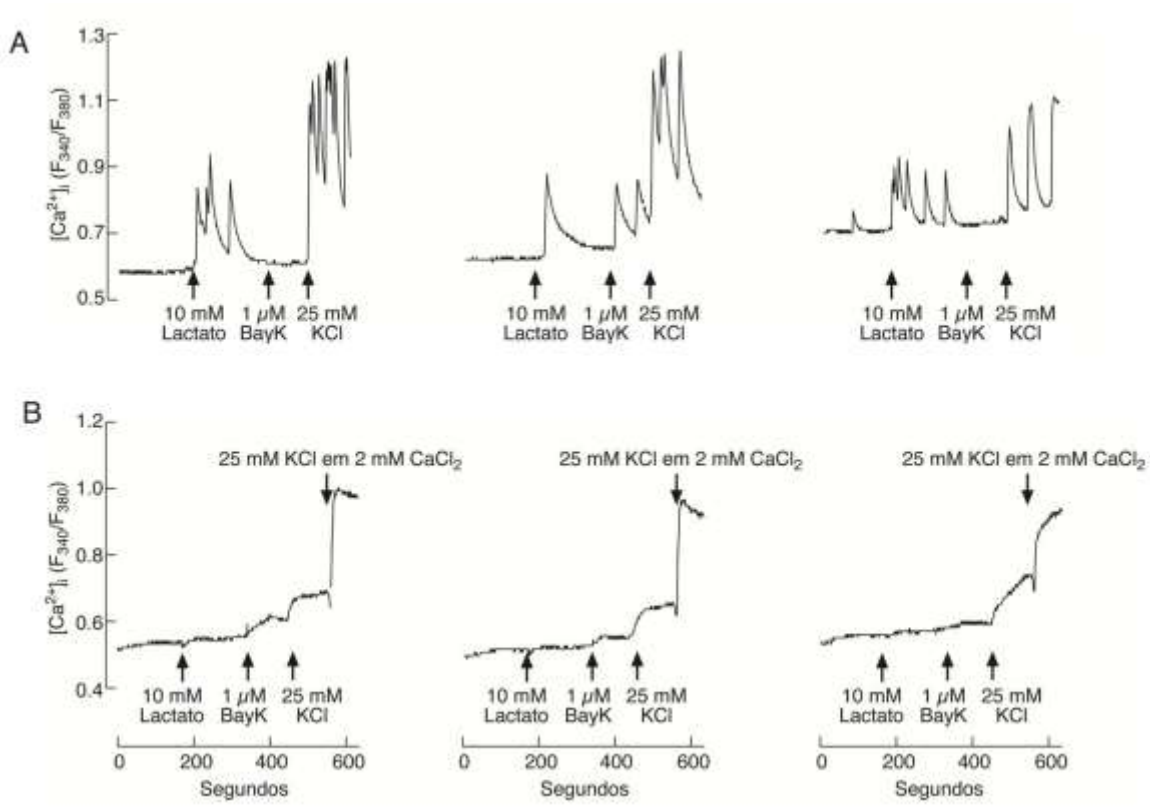
A) Conteúdo de GH no meio de cultura após tratamento por 30 min com 1 mM e 10 mM de lactato, normalizados pelo Ponceau e expressos como média ± erro padrão da média (SEM), em Unidades Arbitrárias (UA). Análise em *One-way ANOVA* e usando Bonferroni como pós-teste. * p<0,05 *vs* Controle. *n* = 4 por grupo de experimentos em triplicata. **B)** Imagem do blot representativa da expressão de GH. **C)** Imagem da coloração das membranas com Ponceau.

Observamos que o estímulo com lactato foi capaz de provocar a secreção de GH em células GH3, por mecanismos dependentes de cálcio, o que foi feito avaliando a sua concentração intracelular. Verificamos que as células GH3 apresentam baixa variação da concentração intracelular de cálcio, a qual foi mantida estável durante os três primeiros minutos da análise.

A figura 20A ilustra três experimentos semelhantes mostrando que ocorre importante aumento de cálcio intracelular após o estímulo com 10 mM de lactato de sódio. Essa resposta é rápida, intensa e fugaz. Após 3 min desta resposta inicial ao lactato, essas mesmas células foram tratadas com 1µM de BayK (agonista de canais de Ca^{2+}) o que permitiu observarmos um aumento do Ca^{2+} intracelular em parte das células. Para ratificarmos tal responsividade, tratamos as células com 25 mM de KCl, quando então observamos que todas elas apresentaram uma elevação intracelular significativa da concentração deste íon, confirmando que a resposta inicial de aumento de Ca^{2+} intracelular decorreu do estímulo com lactato.

Em um segundo experimento, em que estimulamos as células GH3 com lactato de sódio (10 mM) em meio extracelular sem $CaCl_2$, as respostas experimentais foram completamente distintas, já que nessa condição o lactato não promoveu aumento da concentração de cálcio intracelular. Do mesmo modo, nessa condição não houve resposta ao BayK e ao KCl, fato que ocorreu apenas quando as incubamos com KCl na presença de $CaCl_2$, quando houve aumento considerável da sua concentração intracelular (Figura 20B).

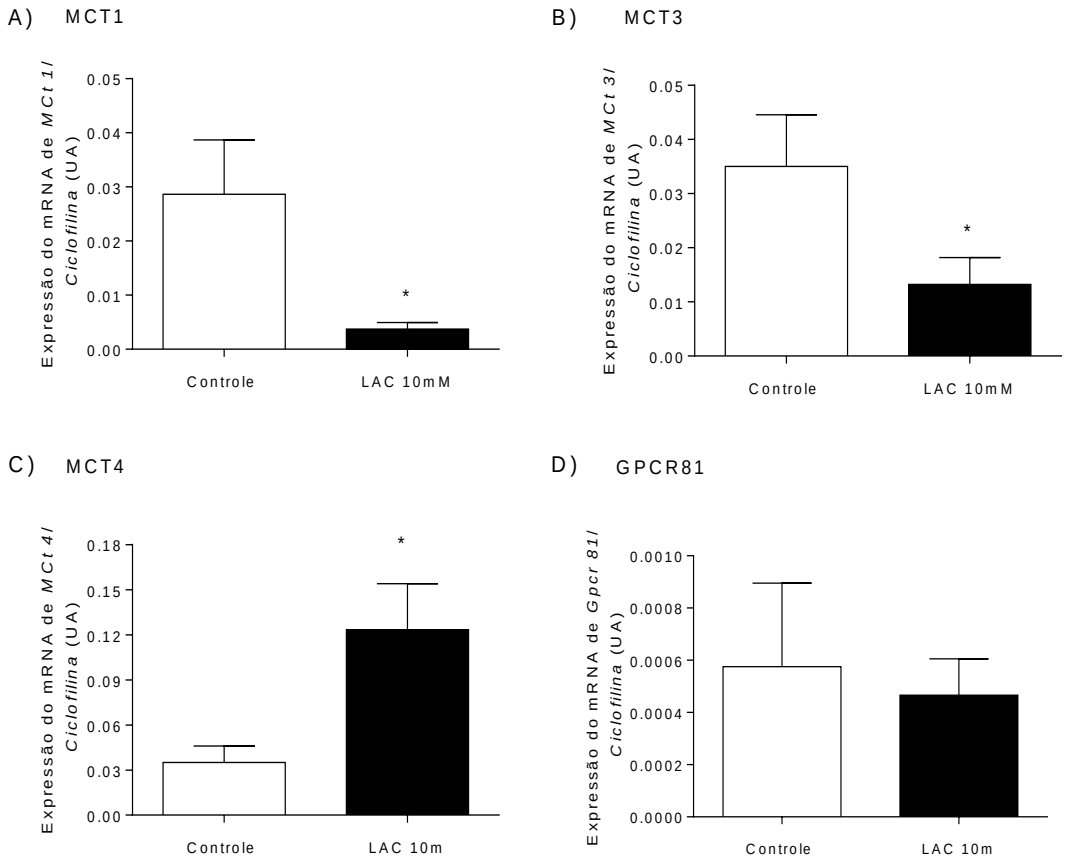
Figure 20 - Efeito do lactato na concentração intracelular de cálcio em células GH3 cultivadas em meio contendo ou não cálcio.



A) Concentração intracelular de cálcio em células GH3 incubadas em meio contendo 2 mM de $CaCl_2$. **B)** Concentração intracelular de cálcio em células GH3 incubadas em meio livre de $CaCl_2$. A última aplicação de KCl foi feita na presença de 2 mM de cálcio. Em ambos os painéis as setas indicam o momento em que foram aplicados lactato, BayK e KCl.

A figura 21 apresenta os resultados da expressão gênica dos transportadores e do receptor de lactato em células GH3 tratadas ou não (controle) com 10 mM de lactato. Observamos nessas células expressão dos mRNA de todos os *Mcts* descritos, com exceção do *Mct*2, que não foi detectado nessas células. Em (A), pode-se observar que após 30 min do tratamento com lactato ocorre uma diminuição significativa da expressão do *Mct*1 ($P<0,05$). Em (B), apresentamos a expressão da isoforma 3 e observamos que, da mesma forma que em (A), o tratamento com lactato reduziu a sua expressão *vs* controle ($P<0,05$). Contudo, com relação ao *Mct*4 (C), o tratamento com lactato aumentou significativamente a sua expressão, após 30 min ($P<0,05$). Quanto ao seu receptor (D), *Gpcr*81, sua expressão gênica é aproximadamente 100 vezes menor que a dos transportadores, e não é afetada pelo tratamento por 30 min com lactato (10 mM).

Figura 21 - Efeito do lactato sobre a expressão gênica dos transportadores de lactato e seu receptor em células GH3.



Expressão do mRNA de: **A)** *Mct*1; **B)** *Mct*3; **C)** *Mct*4; **D)** *Gpcr*81 em células GH3 tratadas com 10 mM de lactato por 30 min. Os valores foram normalizados pela expressão mRNA da *Ciclofilina* e expressos como média ± erro padrão da média (SEM), em Unidades Arbitrárias (UA). Análise em *Test T*. * $p<0,05$ *vs* Controle. n=4 – 6 por grupo de experimentos em triplicata.

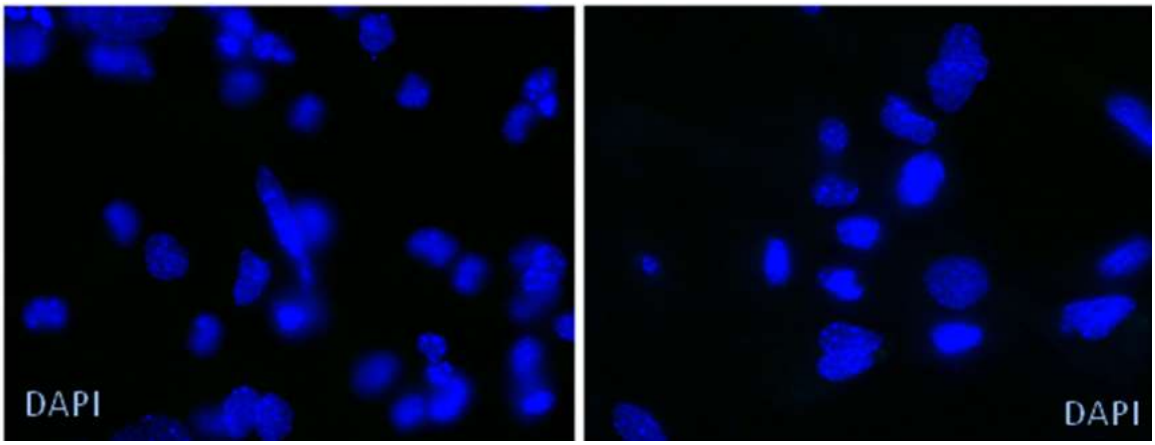
Os experimentos com cultura primária de neurônios hipotalâmicos tiveram o objetivo de analisar a expressão proteica de GHRH e SST em resposta à administração de lactato. Para isso, realizamos diversos controles anteriores ao experimento para assegurarmos a sua eficiência. Iniciamos testando a especificidade de ligação do anticorpo primário adquirido (GHRH e SST), omitindo o anticorpo secundário FITC na reação (Figura 22 - 1a; 1b). Observamos apenas a marcação dos núcleos celulares (DAPI – azul), comprovando que os anticorpos são específicos para as proteínas de interesse. Para completarmos os experimentos controles, preparamos as reações de dupla marcação em condições basais na cultura de neurônios, sem nenhuma estimulação exógena, e identificamos a marcação das proteínas GHRH e SST (FITC – verde) (Figura 22 – 2a e 2b, respectivamente), em neurônios, que foram caracterizados como GHRHérgicos e SSTnérgicos.

No terceiro experimento, classificado como controle positivo, incubamos as células hipotalâmicas, por 30 min, em meio de cultura contendo grelina (10 μM), um peptídio estimulador de células hipotalâmicas, entre elas as GHRHérgicas. O resultado foi um relevante aumento da marcação para GHRH e SST nessas células (Figura 22 – 3a e 3b) quando comparadas com as células não estimuladas. Nota-se também a marcação específica do citossol neuronal e a presença de pequenas esferas ao longo dos axônios dos neurônios (FITC – verde), sugerindo aumento na secreção de vesículas contendo ambas as proteínas.

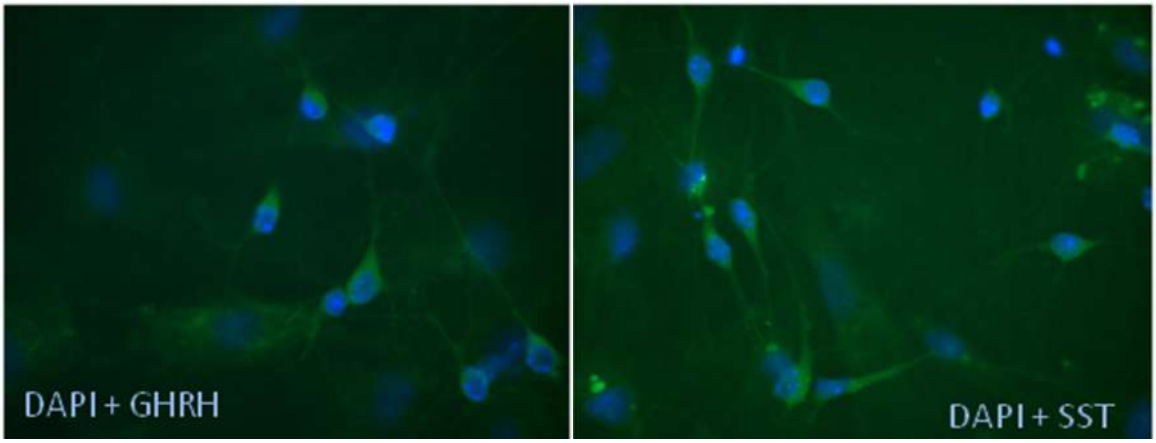
Ao final, efetuamos a incubação da cultura neuronal em meio contendo 10 mM de lactato de sódio, por 30 min, e verificamos uma resposta qualitativa similar às culturas tratadas com grelina, embora em menor magnitude para as duas proteínas estudadas (Figura 22 – 4a e 4b).

Figura 22 - Efeito do lactato (10 mM) sobre a expressão de GHRH e SST de cultura primária de neurônios hipotalâmicos.

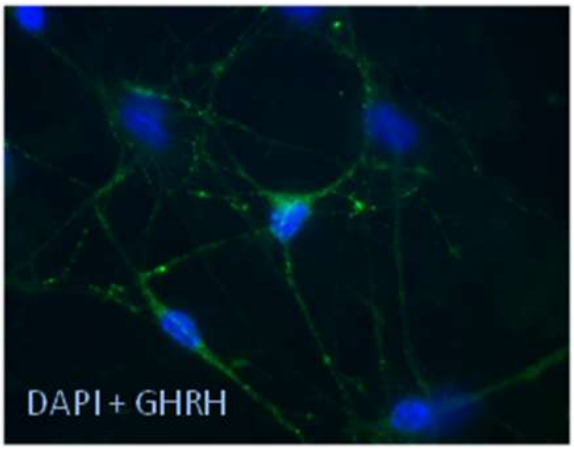
1a) Controle Negativo (GHRH) 1b) Controle Negativo (SST)



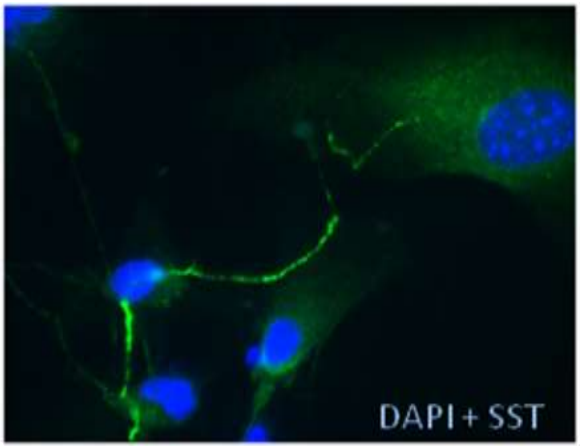
2a) Controle (GHRH) 2b) Controle (SST)



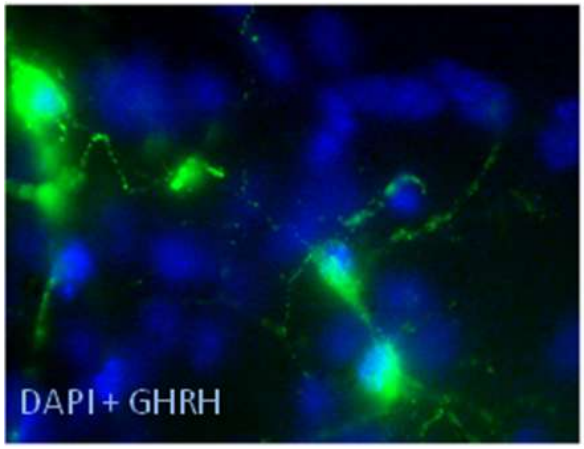
3a) Lactato (GHRH)



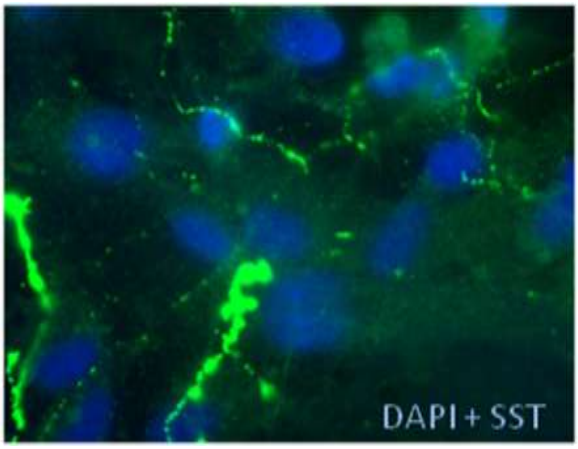
3b) Lactato (SST)



4a) Controle Positivo (GHRH)



4b) Controle Positivo (SST)



1a) e b) Marcação de núcleos (DAPI) (controle negativo). **2a) e b)** Marcação de núcleos (DAPI) e GHRH ou SST (FITC) células do grupo controle. **3a) e b)** Marcação de núcleos (DAPI) e GHRH ou SST (FITC) de células tratadas com lactato por 30 min. **4a) e b)** Marcação de núcleos (DAPI) e GHRH ou SST (FITC) de células tratadas com grelina por 30 min.

7 DISCUSSÃO

Evidenciamos em nosso trabalho de mestrado que a administração de lactato promove aumento da expressão gênica e secreção de GH, e consequente elevação da expressão gênica do *Igf*-1 hepático. Esses dados colocam o lactato como um fator que ativa o eixo somatotrófico, e que poderia contribuir para a elevação da concentração de GH sérico durante a atividade física, condição em que esse metabólito também se encontra aumentado na circulação (SALGUEIRO et al., 2014).

Esses efeitos poderiam resultar de uma ação direta do lactato sobre a hipófise, estimulando a síntese/secreção de GH, ou indireta, regulando a síntese/secreção desses hormônios via hipotálamo, sem descartar a possibilidade de uma ação concomitante nessas duas estruturas. Desta forma, desenvolvemos estudos *in vivo* e *in vitro* com o objetivo de identificar os possíveis sítios (hipotálamo e hipófise) de ação do lactato, bem como os mecanismos envolvidos na resposta do eixo somatotrófico ao mesmo.

Nosso primeiro passo foi avaliar a reposta do hipotálamo à injeção ip de lactato, o que foi feito por meio da análise da expressão de EGR-1 (early growth response gene-1), um fator transcricional que responde rapidamente e de forma transitória a uma variedade de estímulos, sendo largamente utilizado como marcador indireto da atividade neuronal (ALJADA et al., 2002). Assim, observamos que a administração de 10 mM de lactato de sódio aumentou expressivamente o conteúdo de EGR-1 de células localizadas em diversas regiões do hipotálamo (PVH, DMH e LHA), incluindo o Arc e o VMH, regiões que apresentam uma relação importante com o eixo somatotrófico (FROHMAN; NERNARDIS; KANT, 1968 e BLOCH et al., 1983) (figura 5).

A partir desses dados, aprofundamos o estudo sobre o hipotálamo, avaliando a expressão de neurohormônios que regulam a atividade dos somatotrofos. Observamos o aumento significativo da expressão gênica de *Ghrh* logo após 30 min do tratamento com as duas doses de lactato (10 e 100 mM) (figura 6), o que aponta para uma ação deste metabólito sobre essa estrutura. Considerando que a expressão gênica de *Sst* permaneceu inalterada nessa condição (figura 7), inferimos que o GHRH seja o fator determinante para o aumento de GH sérico em resposta ao lactato, que demonstramos no mestrado. O fato de termos observado elevação do mRNA do *Ghrh* e do *Gh*, no mesmo período de tempo (30 min) aponta para uma ação concomitante do lactato nos níveis hipotalâmico e hipofisário.

O aumento da expressão gênica do *Ghrh* hipotalâmico se apresentou de forma fugaz, uma vez que após 60 min do tratamento com 10 mM de lactato, ela retorna a valores

semelhantes aos do grupo controle. Ainda, nesta mesma dose e tempo de tratamento a expressão gênica de *Sst* apresentou-se elevada. Esses resultados podem ser reflexo do aumento do GH sérico observado no período anterior (30 min) (Salgueiro et. al., 2014) ou de uma possível ação tardia estimulatória do lactato sobre neurônios somatostatinérgicos, uma vez que a SST age inibindo a atividade dos neurônios GHRHérgicos (DEVESA; LIMA; TRESGUERRES, 1992; LIPOSITS et al., 1988; OSTERSTOCK et al., 2016), bem como a expressão e secreção hipofisária de GH (SALGUEIRO et al., 2014). Esses dados, em conjunto, indicam que o lactato, já na menor dose estudada, participa de maneira efetiva na regulação da atividade do eixo somatotrófico.

Observamos também que, quando o lactato é administrado na maior dose (100 mM), a expressão gênica do *Ghrh*, que se apresentou reduzida aos 60 min, se mantém elevada nesse período de tratamento. Ademais, não houve qualquer alteração na expressão do gene de *Sst*, o que poderia explicar a manutenção do elevado conteúdo hipotalâmico de mRNA do *Ghrh*. Esse conjunto de dados sugere que altas concentrações de lactato na circulação ativam mecanismos hipotalâmicos que garantem o efeito estimulante do *Ghrh* sobre os somatotrofos por um período de tempo maior, o que manteria a elevada concentração sérica de GH após esse estímulo (SALGUEIRO et al., 2014).

Apesar das alterações no mRNA do *Ghrh* acima descritas, não foi identificada alteração significativa no conteúdo de GHRH no hipotálamo (Figura 8), o que pode ser resultado de um aumento na sua secreção, assim como acontece com o conteúdo do GH hipofisário, condição em que sua concentração plasmática se apresentou significativamente elevada (SALGUEIRO et al., 2014).

Como apontado no nosso estudo do mestrado, a administração do lactato aumentou a expressão do mRNA de *Gh* em 30 min (SALGUEIRO et al., 2014). Considerando a rapidez desse efeito e estudos que mostraram que o aumento da adenilação da cauda poli(A) de mRNAs aumenta sua estabilidade, já que proporciona uma maior proteção frente ao ataque de exoribonucleases, prolongando as suas meias-vidas (BERNSTEIN; ROSS, 1989), analisamos o comprimento da cauda poli(A) dos mRNAs de *Gh*, para avaliar se o tratamento com lactato poderia promover aumento da adenilação destes transcritos, o que configuraria um efeito pós-transcricional do lactato sobre o expressão do gene do GH.

Assim, concomitantemente ao aumento da expressão dos transcritos após 30 min da injeção de lactato, houve aumento significativo no número de adeninas presentes na sua cauda Poli(A) (figura 9), o que poderia explicar, ao menos em parte, o aumento do conteúdo do mRNA do *Gh* observado. Contudo, após 60 min do estímulo com lactato, apesar do conteúdo

de mRNA do *Gh* continuar elevado, o comprimento da sua cauda apresentou-se semelhante à da cauda do transcrito do *Gh* do animal controle, o que reforça que essa elevação fugaz se deva a eventos pós-transcricionais. O fato de que o conteúdo destes transcritos mantém-se elevado após 60 min do tratamento indica que, além de eventos pós-transcricionais (poliadenilação), há uma contribuição de eventos transcricionais, que podem ser dependentes do aumento do GHRH em resposta ao lactato ou de ação direta do lactato na hipófise.

Corroborando esse dado, verificamos que células GH3 pré-tratadas com ACT D (inibidor da transcrição gênica) ainda são capazes de responder ao tratamento com lactato (Figura 17), apresentando expressão significativamente elevada do mRNA de *Gh*, de modo similar às células que não foram pré-tratadas com ACT D. Essa elevação evidencia a ação direta do lactato sobre essas células e que seu estímulo deve-se, pelo menos em parte, a alterações pós-transcricionais.

Retornando aos estudos *in vivo*, tratamos camundongos selvagens e *Lit/ Lit* (os quais não expressam receptores de GHRH, sendo, por isso, espontaneamente anões), com 10 mM de lactato. Primeiramente analisamos a concentração sérica de GH de camundongos selvagens tratados ou não com lactato, e observamos aumento da mesma com o tratamento *vs* animais controle, o que vai ao encontro dos resultados que obtivemos em ratos (Figura 10A) (Salgueiro et al, 2014).

Como esperado, a concentração de GH sérico dos camundongos *Lit/ Lit* se apresentou diminuída *vs* animais selvagens, em função dos seus somatotrofos não serem responsíveis ao estímulo fisiológico de GHRH liberado pelo hipotálamo. Ainda, os animais *Lit/ Lit* que receberam a injeção de lactato apresentaram concentração de GH sérica menor que a dos seus controles, resposta contrária aos efeitos observados nos selvagens (Figura 10A). Isso indica que o efeito estimulatório do lactato depende, pelo menos parcialmente, da sinalização do GHRH nos somatotrofos (*priming*). Adicionalmente, a diminuição do GH sérico pode decorrer de outros mecanismos inibitórios que possam estar atuando sobre a hipófise, como a ativação dos receptores de lactato ($GPCr_{81}$) (KOYAMA et al., 2016), ou pela da ação do neurohormônio SST, já que ambos ativam a proteína G inibitória. Vale lembrar que, em nossos experimentos anteriores, em que ratos foram tratados com lactato ip (figura 7), o conteúdo de mRNA da *Sst* se apresentou aumentado.

Um dado interessante é que, a concentração de TSH nos camundongos selvagens tratados com lactato se mostrou aumentada em relação ao seu controle e o mesmo ocorre com os camundongos *Lit/ Lit*. Esse dado sugere o envolvimento de um mecanismo de ação comum do lactato sobre os somatotrofos e tireotrofos, ou ainda de uma ação hipotalâmica deste

metabólito, que resulta na secreção de TSH. Vale destacar que, diferentemente do que foi observado com o GH, os animais *Lit/ Lit* responderam de forma semelhante aos selvagens com relação ao TSH, mostrando que a ausência do receptor de GHRH não interfere na possível estimulação do lactato sobre o eixo tireotrófico, caracterizando esse resultado como um controle negativo do experimento e principalmente dos resultados encontrados de GH sérico.

A concentração sérica dos hormônios PRL, FSH e ACTH analisada em camundongos selvagens e nos *Lit/ Lit* não se alterou significativamente com a injeção de 10 mM de lactato. Esse dado indica que os efeitos do lactato sobre somatotrofos/tireotrofos ou eixo somatotrófico/tireotrófico são específicos (Figura 10B, C e E). A ausência de expressão dos transportadores de lactato e do seu receptor nesses tipos celulares poderia ser o fator determinante para a deficiência na resposta ao tratamento com lactato, o que merece ser avaliado.

Para verificarmos a importância do transportador de lactato na ativação de regiões hipotalâmicas, bem como do eixo somatotrófico como um todo, desafiamos uma linhagem específica de camundongos que não possuíam um alelo do gene de MCT_1 (KO $MCT_1^{+/-}$) a uma sessão de esforço físico extenuante. Isso porque, sabe-se que o exercício físico estimula a atividade do eixo somatotrófico (REZAEE; KAHRIZI; HEDAYATI, 2014; WIDEMAN et al., 1999) e o MCT_1 possui grande importância no controle da concentração de lactato, corpos cetônicos e ácidos graxos de cadeias curtas (LENGACHER et al., 2013; MAEKAWA et al., 2008), metabólitos esses que podem estimular o eixo somatotrófico.

Inicialmente analisamos a expressão da proteína de MCT_1 em todos os tecidos envolvidos no eixo somatotrófico para confirmar se os animais utilizados no experimento teriam características diferentes das encontradas nos animais selvagens. Verificamos (figura 11) que os animais KO $MCT_1^{+/-}$ apresentaram menor expressão desses transportadores no hipotálamo, hipófise e fígado, confirmando a efetividade do procedimento, de forma semelhante ao que já havia sido descrito anteriormente (CARNEIRO et al., 2016; LENGACHER et al., 2013; MORRISON et al., 2015). Notou-se também que o exercício físico não alterou a expressão de MCT_1 destes tecidos, nas linhagens estudadas, mostrando a importância da estabilidade proteica dessa isoforma às condições fisiológicas extremas, uma vez que sua distribuição no organismo é ubíqua (CARNEIRO; PELLERIN, 2015).

O protocolo experimental constituiu de uma única sessão de exercício até exaustão, com intuito de saber se o eixo somatotrófico de camundongos KO $MCT_1^{+/-}$ estaria tão ativado quanto o dos animais selvagens. Durante a execução do protocolo nenhuma diferença

qualitativa em relação ao padrão de movimento dos animais foi constatada, contudo os animais KO $MCT_1^{+/-}$ entraram em fadiga mais rapidamente quando comparamos com os selvagens, mostrando que esses transportadores são fundamentais para manutenção do exercício físico (figura 12A). Não foi possível identificar se a razão da fadiga foi central ou periférica, mas provavelmente o fluxo de lactato e de íons H^+ esteve comprometido na musculatura ou em regiões centrais (THOMAS et al., 2005), tornando os animais inaptos em manter a atividade física em condições ideais frente ao estímulo.

Antes e depois do protocolo de exercício extenuante, analisamos alguns parâmetros funcionais e metabólicos e os animais controles apresentaram respostas específicas ao exercício extenuante de alta intensidade, sendo que a concentração de glicose diminuiu (figura 12B) e a de lactato sanguíneo se elevou significativamente (figura 12C). Ainda, notamos que os animais KO $MCT_1^{+/-}$ também apresentaram as mesmas respostas, evidenciando que o desafio experimental foi eficaz na perturbação da homeostase metabólica de ambas as linhagens e que provavelmente essas respostas metabólicas são condições inespecíficas entre as linhagens estudadas.

Em condições de exercício físico, notamos um grande aumento da expressão gênica (figura 13A) e proteica de GHRH (figura 13B) nos animais selvagens e KO $MCT_1^{+/-}$ e, assim como nos somatotrofos, é possível que o lactato esteja atuando diretamente sobre neurônios GHRHérgicos. O aumento da atividade desses neurônios pode resultar em estimulação das células somatotróficas, em ambas as linhagens. Para saber se o aumento do lactato gerado pelo exercício foi um dos diversos fatores que estariam estimulando o eixo desses animais, analisamos a expressão de GHRH de animais KO $MCT_1^{+/-}$ que receberam apenas uma injeção de lactato, sem efetuar o protocolo de exercício (figura 13B). Assim, notamos que a expressão de GHRH desses animais não se altera, demonstrando que o MCT1 é importante para a ativação desses neurônios na resposta apenas ao lactato, e que no exercício outros eventos estão contribuindo com tal incremento.

Na mesma condição de exercício avaliamos a expressão gênica (figura 13C) e proteica de SST (figura 13D), e observamos que esses parâmetros não se alteram nos animais selvagens, o que contribui para explicar o aumento da atividade do eixo somatotrofico em resposta ao exercício físico nos mesmos, uma vez que esse hormônio é o mais importante inibidor deste eixo (WIDEMAN, L. et al., 1999). Já os animais KO $MCT_1^{+/-}$ apresentaram um perfil de expressão de SST que tende a aumentar em reposta ao protocolo de exercício. Esse resultado pode ser crucial, uma vez que a maior atividade de neurônios somatostatinérgicos pode deprimir a do eixo somatotrófico analisado posteriormente. O resultado foi ratificado

nos experimentos com injeção de lactato no grupo KO $MCT_1^{+/-}$, que resultou num aumento da expressão de SST nos mesmos animais (figura 13D), uma vez que pode existir outros transportadores nessa estrutura, como MCT2 e 4 (CORTES-CAMPOS et al., 2013).

Ainda, análises da expressão de genes hipotalâmicos relacionados o consumo alimentar e ao gasto energético mostraram efeitos conflitantes em resposta ao exercício físico intenso. Observamos que o protocolo aplicado aumentou a expressão gênica de *Npy*, que é um peptídeo orexígeno (figura 13E), bem como de *Pomc*, que é anorexígeno (figura 13F), em ambas as linhagens estudadas, Esses resultados precisam ser melhor explorados, afim de identificarmos o papel do exercício sobre genes relacionados ao consumo energético. Sabe-se que o lactato, assim como a alteração na concentração de glicose, regulam a expressão de neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos localizados no hipotálamo (BLOUET; SCHWARTZ, 2010; CORTES-CAMPOS et al., 2013)

Quando analisamos os possíveis efeitos do exercício, e das alterações da expressão do GHRH e da SST hipotalâmicos dele decorrentes, sobre a expressão do GH de animais selvagens, verificamos que a somatória desses eventos resulta em maior expressão gênica de *Gh* e maior concentração de GH sérico, sem alterar o seu conteúdo hipofisário deste hormônio. Tais dados mostram que esses animais respondem positivamente a ambos os estímulos, corroborando nossa hipótese e outros estudos que mostraram um aumento da atividade do eixo pelo exercício físico (GODFREY; MADGWICK; WHYTE, 2003; WIDEMAN et al., 2002). O aumento do transcrito de *Gh* (figura 14A) sugere que maior quantidade de GH esteja sendo sintetizada e simultaneamente secretada (figura 14B), resultando em maior concentração sérica deste hormônio (figura 15), corroborando a hipótese elaborada no trabalho gerado no mestrado (SALGUEIRO et al., 2014).

Por outro lado, animais KO $MCT_1^{+/-}$ apresentaram respostas totalmente opostas ao exercício físico *vs* selvagens, de modo que todos os parâmetros que estavam aumentados nestes, se apresentaram diminuídos ou inalterados no grupo KO $MCT_1^{+/-}$ exercitado. A expressão gênica e proteica de GH inalteradas e a diminuição da concentração sérica de GH indicam que animais com menor expressão de MCT1 não apresentam ativação do eixo somatotrófico, como ocorre nos animais selvagens, frente ao estímulo de exercício físico. Esse resultado pode se dever à maior atividade dos neurônios SSTérgicos (figura 13D) e à menor ativação dos somatotrofos (figuras 14A, B, e 15). Vale ressaltar que no estado basal a expressão hipofisária de GH e sua concentração sérica são maiores no grupo KO $MCT_1^{+/-}$ *vs* animais selvagens, indicando que a ausência parcial desse transportador gera animais com

distúrbios hormonais e respostas adversas aos diferentes estímulos (LENGACHER et al., 2013).

Por fim, analisamos os efeitos do exercício e das alterações do GH desses mesmos animais sobre a expressão gênica (Figura 16A) e proteica de IGF-1 (Figura 16B), um importante indicador da atividade somatotrófica (MAITER et al., 1988; SALGUEIRO et al., 2014). Os animais selvagens não apresentaram alteração na expressão gênica de *Igf*-1, mas um aumentado conteúdo proteico deste hormônio, indicando que o eixo está ativado em resposta ao exercício. Contudo, os animais KO $MCT_1^{+/-}$ não apresentaram qualquer alteração destes parâmetros, como esperado, uma vez que a concentração sérica de GH, seu principal hormônio estimulador, não está aumentada.

Para compreendermos os possíveis mecanismos pelos quais o lactato poderia atuar sobre os somatotrofos, analisamos a expressão gênica dos transportadores de lactato nas células GH3, e observamos que a do *Mct* 2 é inexistente, enquanto que a dos *Mcts* 1, 3 e 4 é bastante expressiva (Figura 21). Nota-se também que nessas células há expressão do gene do receptor de lactato (*Gpcr* 81), embora muito menor do que a dos transportadores de lactato. Esses dados indicam a possibilidade do lactato exercer seus efeitos interagindo com seu receptor, bem como intracelularmente via MCTs (1, 3 e 4). É interessante comentar que quando as células GH3 foram tratadas com 10 mM de lactato, por 30 min, ocorreu uma redução significativa no conteúdo do mRNA dos *Mcts* 1 e 3, e um aumento no do *Mct* 4. Chama a atenção que os *Mcts* 1 e 3, os quais foram negativamente regulados pelo lactato, possuem menores K_m para lactato (3,5 e 6,0 mM, respectivamente) ao contrário da isoforma 4, que é positivamente regulada pelo lactato e possui maior K_m para lactato (28 mM) (CARNEIRO; PELLERIN, 2015). Esses dados sugerem que as células GH3 podem ser sensibilizadas pelo aumento extracelular de lactato, o qual, quando aumentado, leva ao aumento da expressão da isoforma 4, possibilitando assim, maior fluxo desse metabólito. Contudo, se faz necessário avaliar o conteúdo dessas proteínas, uma vez que no nosso estudo *in vivo*, ao menos o conteúdo de MCT1 (figura 11) não se alterou com o exercício.

Após a identificação desses transportadores nas células GH3, partimos para avaliar a sua participação no efeito estimulante do lactato sobre a expressão gênica do *Gh*, já que demonstramos que o lactato (10 mM) também atua diretamente na hipófise promovendo aumento da expressão gênica de *Gh* (Figura 17) e do conteúdo de GH (Figura 18) após 30 min da sua administração, dado que corrobora nossos resultados obtidos *in vivo* (SALGUEIRO et al., 2014). Esta ação pode envolver eventos pós-transcricionais, já que observamos uma elevação rápida do conteúdo de GH e que, no estudo *in vivo*, detectamos um aumento do

número de adeninas da cauda poli(A) do mRNA de *Gh* em 30 min, em resposta ao lactato, o que está associado ao aumento da eficiência da sua tradução. O lactato, ainda, poderia promover diminuição da degradação de GH, uma vez que se sabe que o mesmo suprime a expressão de proteínas, como Caspase 1, que está envolvida com a proteólise, via GPCR81 (HOQUE et al., 2014).

Esses dados corroboram os achados e as hipóteses elaboradas anteriormente (Salgueiro et al., 2014) que mostraram um aumento de GH sérico em ratos que receberam injeção ip de lactato, e atingem um dos objetivos desse estudo que é caracterizar uma possível ação direta do lactato sobre a hipófise, o que o coloca como um fator metabólico importante no controle da atividade de células somatotróficas.

O bloqueio dos transportadores de lactato, os MCTs, com CHC aboliu o seu efeito sobre o aumento da expressão gênica de *Gh*, o que indica que a ação do lactato depende da sua entrada nas células (Figura 17). Ainda, detectamos aumento do conteúdo de GH no meio em que as células GH3 foram cultivadas, dado indicativo que o lactato também induziu a secreção de GH (Figura 19).

Considerando que estudos de Chang et al (2015) mostraram que o lactato, em conjunto com íons H^+, induz aumento rápido do conteúdo intracelular de cálcio em células glomerulares do corpo carotídeo, partimos para avaliar se o lactato poderia promover ação semelhante nas células GH3, o que provocaria inserção de vesículas contendo GH na membrana celular e a secreção deste hormônio, uma vez que é amplamente conhecida a importância do aumento de cálcio intracelular para a secreção hormonal, em geral.

Os estudos que se sucederam confirmaram nossa hipótese, já que mostraram um aumento intracelular de cálcio nas células GH3 em resposta ao lactato, efeito que não ocorreu quando o $CaCl_2$ foi removido do meio de cultura, demonstrando que o lactato promove aumento do influxo de cálcio nas células. Do mesmo modo, verificamos que o aumento do cálcio intracelular nas células GH3 em resposta ao BayK ou KCl foi abolido na ausência de cálcio extracelular, e que ele reaparece quando as células GH3 são incubadas em meio contendo $CaCl_2$, o que comprova que as células continuavam viáveis e responsivas ao tratamento (Figura 20).

Assim, nossos dados sugerem que o lactato promove secreção de GH por células somatotróficas mediante ativação de canais de cálcio, o que provoca entrada desse íon e elevação da sua concentração intracelular. É possível que o lactato, assim como a glicose nas células beta pancreáticas, entre e seja metabolizado nos somatotrofos, aumentando a razão ATP/ADP, com consequente fechamento de canais de K sensíveis ao ATP (os canais Katp)

(RUTTER et al., 2015). Desse modo, ocorreria elevação da concentração de potássio no interior das células GH3, causando despolarização de suas membranas e abertura de canais de Ca^{++} permitindo o influxo deste íon (SANTULLI et al., 2015). Já é sabido que as células GH3 possuem canais Katp e que os mesmos são sensíveis a lactato, uma vez que o mesmo pode ser rapidamente metabolizado, gerando ATP (PARSONS; HIRASAWA, 2010; WU; LI; CHIANG, 2000).

Nos experimentos de cultura primária de neurônios hipotalâmicos de camundongos foi possível identificar a presença de neurônios que expressam GHRH e SST (Figura 22B). Após o tratamento dessas células com 10 mM de lactato, por 30 min, observamos aumento na intensidade de marcação desses dois neurohormônios em relação às culturas controle, não tratadas, o que mostra que essas células são sensíveis ao aumento da concentração de lactato extracelular. O aumento da expressão de ambas às proteínas, como havíamos sugerido anteriormente, parece ser fundamental para o controle energético do indivíduo nessa situação, uma vez que a glicemia necessita ser finamente controlada, e que um aumento do lactato na circulação indica aumento do ritmo glicolítico e das necessidades energéticas do organismo (RODRÍGUEZ-PACHECO et al., 2008).

Vale ressaltar que, após o tratamento com lactato, observa-se em ambas as células a formação de pequenos compartimentos intensamente marcados ao longo dos seus axônios, sugerindo que, simultaneamente ao aumento da expressão desses neurohormônios, ocorre a formação de vesículas de armazenamento e secreção dos mesmos, o que parece garantir a manutenção do seu conteúdo proteico intracelular (Figura 24a e b). Esses dados se assemelham aos nossos obtidos nos experimentos com células GH3 tratadas com lactato, que apresentaram maior secreção de GH, e conteúdo proteico intracelular muito similar ao das células controles não tratadas.

O tratamento dessas culturas com grelina, um importante estimulador da secreção de GH e de outros neurohormônios hipotalâmicos (GUAN et al., 1997; MUCCIOLI et al., 1998; RHODES et al., 2018), desencadeou a mesma resposta de aumento da expressão e de formação de vesículas observada com o lactato, contudo a magnitude dos fenômenos encontrados com esse protocolo foi nitidamente maior, caracterizando um importante controle positivo do experimento (Figura 22D).

Os resultados obtidos neste experimento, do mesmo modo que nossos estudos anteriores apontam fortemente para uma ação do lactato sobre o hipotálamo, onde poderia atuar elevando a secreção de GHRH e SST, o que contribuiria para o controle da secreção de GH.

Em suma, o conjunto dos dados apresentados neste estudo indica que o lactato regula a atividade do eixo somatotrófico, tanto ao nível do hipotálamo quanto da hipófise, exercendo um importante papel estimulante da síntese e liberação do GH. Essa ação pode contribuir com a elevação do GH que ocorre em resposta ao exercício físico, bem como em resposta a uma demanda metabólica intensa, condições em que esse metabólito aumenta na circulação, quando a secreção de GH torna-se importante, em função dos seus efeitos hiperglicemiantes e lipolíticos, fundamentais para a manutenção da homeostase energética.

8 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o lactato pode ser considerado um potente estimulador do eixo somatotrófico. Em ações sobre o sistema nervoso central, ele aumenta o conteúdo de transcritos de neurohormônios hipotalâmicos envolvidos com a síntese e secreção de GH, bem como aumenta a atividade de outros neurônios hipotalâmicos. O mesmo foi capaz de aumentar a estabilidade e o conteúdo do mRNA de *Gh*, e o GH sérico, contudo seus efeitos são intrinsecamente dependentes da expressão de transportadores nos tecidos alvos, conforme demonstrado nos estudos *in vivo*.

Ainda, nosso trabalho caracterizou células somatolactotróficas quanto à expressão de transportadores e receptores relacionados à ação do lactato sobre as mesmas, possibilitando compreender a resposta de aumento no conteúdo e secreção de GH deve-se a mecanismos dependentes de seu influxo, bem como de um consecutivo influxo de cálcio, como observado no estudo *in vitro*.

Assim, nossos achados corroboram os dados que apontam o lactato como um elemento importante para a atividade hipotalâmica em geral e, principalmente, que ele é um agente estimulador da atividade do eixo somatotrófico nos diferentes tecidos que o constituem, conforme fora sugerido na hipótese inicial do mestrado. Esses dados, além de acrescentarem novas informações a este campo do conhecimento, levanta a possibilidade de uma perspectiva terapêutica para o lactato, rompendo o paradigma de que ele seja apenas um produto de descarte no metabolismo da glicose e causador de acidose metabólica.

REFERÊNCIAS*

AINSCOW, E. K. et al. Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels. **The Journal of Physiology**, v. 544, n. Pt 2, p. 429–445, 15 out. 2002.

ALJADA, A. et al. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 3, p. 1419–1422, mar. 2002.

BERNSTEIN, P.; ROSS, J. Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, n. 9, p. 373–377, set. 1989.

BLOCH, B. et al. Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain. **Nature**, v. 301, n. 5901, p. 607–608, 17 fev. 1983.

BLOUET, C.; SCHWARTZ, G. J. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. **Behavioural Brain Research**, v. 209, n. 1, p. 1–12, 1 maio 2010.

CARNEIRO, L. et al. Evidence for hypothalamic ketone body sensing: impact on food intake and peripheral metabolic responses in mice. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 310, n. 2, p. E103-115, 15 jan. 2016.

CARNEIRO, L.; PELLERIN, L. Monocarboxylate transporters: new players in body weight regulation. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 16 Suppl 1, p. 55–66, fev. 2015.

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.

CORRÊA-DE-SANTANA, E. et al. Modulation of growth hormone and prolactin secretion in Trypanosoma cruzi-infected mammosomatotrophic cells. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 3, p. 208–212, 2009.

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 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, jun. 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, mar. 1987.

DEVESA, J.; LIMA, L.; TRESGUERRES, J. A. F. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 3, n. 5, p. 175–183, jul. 1992.

FODOR, M. et al. Growth hormone-releasing hormone, somatostatin, galanin and beta-

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

FROHMAN, L. A.; NERNARDIS, L. L.; KANT, K. J. Hypothalamic stimulation of growth hormone secretion. **Science (New York, N.Y.)**, v. 162, n. 3853, p. 580–582, 1 nov. 1968.

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.

GRANCHI, C. et al. Inhibitors of Lactate Dehydrogenase Isoforms and their Therapeutic Potentials. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 672–697, 1 mar. 2010.

GUAN, X. M. et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 48, n. 1, p. 23–29, ago. 1997.

GUILLEMIN, R. et al. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. **Science (New York, N.Y.)**, v. 218, n. 4572, p. 585–587, 5 nov. 1982.

HOQUE, R. et al. Lactate Reduces Liver and Pancreatic Injury in Toll-Like Receptor– and Inflammasome-Mediated Inflammation via GPR81-Mediated Suppression of Innate Immunity. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1763–1774, jun. 2014.

IDE, K.; SECHER, N. H. Cerebral blood flow and metabolism during exercise. **Progress in Neurobiology**, v. 61, n. 4, p. 397–414, jul. 2000.

ITOH, K. et al. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. **Brain research**, v. 175, n. 2, p. 341–346, 19 out. 1979.

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, ago. 1998.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 656–660, 9 dez. 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.

LENGACHER, S. et al. Resistance to diet-induced obesity and associated metabolic perturbations in haploinsufficient monocarboxylate transporter 1 mice. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e82505, 2013.

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.

LIPOSITS, Z. et al. Synaptic communication between somatostatinergic axons and growth hormone-releasing factor (GRF) synthesizing neurons in the arcuate nucleus of the rat. **Histochemistry**, v. 89, n. 3, p. 247–252, 1988.

MAEKAWA, F. et al. Basal and stimulated lactate fluxes in primary cultures of astrocytes are differentially controlled by distinct proteins. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, n. 3, p. 789–798, nov. 2008.

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, out. 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, ago. 1988.

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, jul. 1996.

MORRISON, B. M. et al. Deficiency in monocarboxylate transporter 1 (MCT1) in mice delays regeneration of peripheral nerves following sciatic nerve crush. **Experimental Neurology**, v. 263, p. 325–338, jan. 2015.

MUCCIOLI, G. et al. Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. **The Journal of Endocrinology**, v. 157, n. 1, p. 99–106, abr. 1998.

NELSON, R. J.; TRAINOR, B. C. Neural mechanisms of aggression. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 536–546, jul. 2007.

OVERGAARD, M. et al. Hypoxia and exercise provoke both lactate release and lactate oxidation by the human brain. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 7, p. 3012–3020, 7 jan. 2012.

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, 16 jun. 2010.

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, maio 1999.

RASMUSSEN, P.; WYSS, M. T.; LUNDBY, C. Cerebral glucose and lactate consumption during cerebral activation by physical activity in humans. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 9, p. 2865–2873, 9 jan. 2011.

REZAEE, S.; KAHRIZI, S.; HEDAYATI, M. Hormonal responses of combining endurance-resistance exercise in healthy young men. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, v. 54, n. 2, p. 244–251, abr. 2014.

RHODES, L. et al. Capromorelin: a ghrelin receptor agonist and novel therapy for stimulation of appetite in dogs. **Veterinary Medicine and Science**, v. 4, n. 1, p. 3–16, fev. 2018.

RIVIER, J. et al. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. **Nature**, v. 300, n. 5889, p. 276–278, 18 nov. 1982.

RODRÍGUEZ-PACHECO, F. et al. Ghrelin induces growth hormone secretion via a nitric oxide/cGMP signalling pathway. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 3, p. 406–412, mar. 2008.

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, abr. 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, out. 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, abr. 2002.

RUTTER, G. A. et al. Pancreatic β-cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. **The Biochemical Journal**, v. 466, n. 2, p. 203–218, 1 mar. 2015.

SALGUEIRO, R. B. et al. Lactate activates the somatotropic axis in rats. **Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society**, 2 out. 2014.

SANTULLI, G. et al. Calcium release channel RyR2 regulates insulin release and glucose homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 5, p. 1968–1978, maio 2015.

SCHIFFER, T. et al. Lactate infusion at rest increases BDNF blood concentration in humans. **Neuroscience letters**, v. 488, n. 3, p. 234–237, 25 jan. 2011.

SHAMMAH-LAGNADO, S. .; ALHEID, G. .; HEIMER, L. Afferent connections of the interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure and adjacent amygdalostriatal transition area in the rat. **Neuroscience**, v. 94, n. 4, p. 1097–1123, nov. 1999.

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, jun. 1985.

SMITH, D. et al. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 23, n. 6, p. 658–664, jun. 2003.

SPIESS, J.; RIVIER, J.; VALE, W. Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. **Nature**, v. 303, n. 5917, p. 532–535, 9 jun. 1983.

TANNENBAUM, G. S.; BOWERS, C. Y. Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin. **Endocrine**, v. 14, n. 1, p. 21–27, fev. 2001.

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, mar. 2005.

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, jun. 2009.

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, set. 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.

WU, S. N.; LI, H. F.; CHIANG, H. T. Characterization of ATP-sensitive potassium channels functionally expressed in pituitary GH3 cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 178, n. 3, p. 205–214, 1 dez. 2000.

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, nov. 2008.

YOON, H. et al. Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 234, n. 1, p. 90–94, 8 maio 1997.

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, ago. 2001.