

Ana Cláudia Alves Serafim

AÇÃO CENTRAL DO LACTATO NO METABOLISMO DE AMÔNIA  
DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2012

Ana Cláudia Alves Serafim

AÇÃO CENTRAL DO LACTATO NO METABOLISMO DE AMÔNIA  
DURANTE O EXERCÍCIO FÍSICO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências do Esporte da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências do Esporte.

Área de concentração: Fisiologia do Exercício

Orientador: Dr. Nilo Resende Viana Lima

Co-orientador: Dr. Luiz Cláudio Cameron

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais

2012



Universidade Federal de Minas Gerais  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte



Dissertação intitulada “**Ação central do lactato no metabolismo de amônia durante o exercício**”, de autoria da mestranda **Ana Claudia Alves Serafim**, defendida em 21 de setembro de 2012, na Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais e submetida à banca examinadora composta pelos professores:

Prof. Dr. Nilo Resende Viana Lima  
Departamento de Esportes  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Thales Nicolau Prímola Gomes  
Departamento de Educação Física  
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Samuel Penna Wanner  
Departamento de Esportes  
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 21 de setembro de 2012.

“Em trabalhos práticos, qualquer aluno pode fazer experimentos para verificar a exatidão de uma hipótese científica. Mas o homem, porque não tem senão uma vida, não tem nenhuma possibilidade de verificar a hipótese através de experimentos, de maneira que não saberá nunca se errou ou acertou ao obedecer a um sentimento. Tudo é vivido pela primeira vez e sem preparação. Como se um ator entrasse em cena sem nunca ter ensaiado.

Pelo fato da vida ser, relativamente, tão curta e não comportar “reprises”, para emendarmos nossos erros, somos forçados a agir, na maior parte das vezes, por impulsos, em especial nos atos que tendem a determinar nosso futuro. Somos como atores convocados a representar uma tragédia (ou comédia), sem ter feito um único ensaio, apenas com uma ligeira e apressada leitura do script. Nunca saberemos, de fato, se a intuição que nos determinou seguir certo sentimento foi correta ou não. Não há tempo para essa verificação. Por isso, precisamos cuidar das nossas emoções com carinho muito especial.”

*Milan Kundera*

## AGRADECIMENTO

Ao povo brasileiro pelo financiamento de meus estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade do curso que é oferecido com qualidade, apesar de todas as dificuldades enfrentadas.

Ao professor Dr. Nilo Resende Viana Lima pela confiança depositada, exemplo de ética profissional e mais do que isso, pela paciência e compreensão.

À professora Dra. Danusa Dias Soares pelo acompanhamento e ajuda no financiamento do trabalho.

Ao professor Dr. Samuel Penna Wanner, pela paciência, pelo exemplo de professor, pelo auxílio sempre que necessário e pela honra em tê-lo como membro da banca avaliadora deste trabalho.

Ao professor Dr. Thales pelo exemplo e pela honra em tê-lo como membro da banca avaliadora deste trabalho.

À professora Dra. Leida Maria Botion, ao professor Dr. Candido Coimbra e à professora Dra. Adaliene Ferreira pelo acesso irrestrito aos seus laboratórios. Obrigada por apoiar os trabalhos realizados no LAFISE.

Aos demais professores desta escola pelo que foram ou pelo que tentaram ser.

À Dra. Adriana Bassini, à Marina Chaves de Oliveira e aos alunos Fernando Marçal de Souza e Leonardo Miranda Damasceno pela ajuda nas dosagens das amostras deste estudo.

Ao Washington Pires, à Ivana Alice e à Milene Malheiros pelo auxílio no trabalho, pelo companheirismo durante todos estes anos, pelos momentos de alegria, pela amizade e sabedoria compartilhada. Eu não iria conseguir realizar esse trabalho sem vocês.

Aos grandes amigos que fiz no mestrado, pelo compartilhamento do conhecimento e momentos de descontração, em especial Patrícia, Cletiana e Renata.

À Letícia Cordeiro e à Débora Lacerda pela ajuda nas dosagens das amostras deste estudo e mais do que isso, pela paciência.

As minhas grandes amigas Gleici, Flavinha, Carol, Vê, Tá, Aninha e Pó pelo carinho. Desculpe-me pela ausência.

Ao meu pai, que mesmo não mais presente, sempre acreditou em minha capacidade de vencer os desafios da vida.

À minha mãe, pela paciência, pela compreensão e por acreditar em mim. Obrigada pelo apoio necessário para a realização deste percurso.

Ao meu irmão, Nilo, pela paciência. Obrigada pela ajuda ininterrupta. Será sempre meu exemplo de ética.

Ao meu namorado, Léo, pela incondicional paciência e compreensão, pela ajuda nesses últimos anos e pela sabedoria compartilhada.

À minha família e à família do Léo pelos momentos de alegria e amizade.

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE), da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional (EEFFTO) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e contou com a colaboração da Dra. Adriana Bassini (Laboratório de Metabólicos e Bioquímica do Exercício da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro), do Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli e seus orientandos Fernando Marçal de Souza e Leonardo Miranda Damasceno (Laboratório de Imunoparasitologia da UFMG), da Dra. Leida Maria Botion e sua orientanda Letícia Maria de Souza Cordeiro (Laboratório de Metabolismo Celular da UFMG), da Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira (Laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais) e ajuda das alunas Marina Chaves de Oliveira e Débora Romualdo Lacerda. Os recursos financeiros necessários para a execução do trabalho foram concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## RESUMO

Durante o exercício físico, o aumento na produção de amônia é um efeito combinado tanto da desaminação das purinas nucleotídeos quanto do catabolismo dos aminoácidos. Os valores da concentração de amônia atingidos, durante o exercício físico, são extremamente elevados ao se comparar com os valores de repouso, podendo aumentar em até 100%. Por esse motivo, o presente estudo tenta explicar porque é possível a ocorrência desse aumento, sem o comprometimento do funcionamento dos órgãos. A questão se torna relevante, pois durante o exercício a concentração de amônia chega a 150  $\mu\text{M}$ ; se um indivíduo alcançasse esse valor em repouso, essa hiperamonemia seria considerada um estado patológico. Especula-se que o lactato é imprescindível para proteger o sistema do excesso de amônia, influenciando no metabolismo dos compostos nitrogenados. Para testar a hipótese, foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* pesando 300 g. Os ratos foram submetidos aos implantes de uma cânula guia cerebral e de uma cânula na veia jugular. Após a recuperação da cirurgia, os animais foram divididos em grupos: exercício na velocidade de 21  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  ou 60 minutos de repouso na própria gaiola, na temperatura ambiente de 25°C. Cada animal foi submetido à quatro situações experimentais com intervalo de 48 horas: injeção central de salina; amônia; lactato e amônia mais lactato. Foi observada maior concentração de lactato e de amônia no grupo que foi submetido ao exercício físico comparado ao grupo repouso. A injeção ICV de lactato causou um aumento na concentração do mesmo no minuto 15 ( $4,4 \pm 0,2 \text{ mM}$ ) e na interrupção do esforço ( $5,4 \pm 0,2 \text{ mM}$ ) em comparação a situação controle (15 min  $3,3 \pm 0,3 \text{ mM}$ ,  $P = 0,01$ ; IVE  $4,3 \pm 0,3 \text{ mM}$ ,  $P = 0,007$ ), a situação amônia (15 min  $3,5 \pm 0,2 \text{ mM}$ ,  $P = 0,002$ ; IVE  $3,2 \pm 0,2 \text{ mM}$ ,  $P < 0,001$ ) e a situação amônia mais lactato (15 min  $3,6 \pm 0,3 \text{ mM}$ ,  $P = 0,04$ ; IVE  $3,9 \pm 0,3 \text{ mM}$ ,  $P < 0,001$ ) e uma menor concentração de amônia no minuto 5 e na interrupção voluntária do esforço em comparação a situação controle (min 5  $P = 0,02$ ; IVE  $P < 0,001$ ). Assim, a concentração de amônia na interrupção voluntária do esforço em ratos não diferiu daquelas encontradas nos casos patológicos, porém não houve nenhum dano ao organismo, já que o lactato reduziu os efeitos da hiperamonemia no metabolismo energético.

**Palavras chave:** Ratos. Aminoácidos. Substrato Energético. Neutralização. Ciclo da Purina Nucleotídeo.



## ABSTRACT

During exercise, the increase in the production of ammonia is a combined effect of both the deamination of purine nucleotides as catabolism of amino acids. The values of ammonia concentration reached during exercise are extremely high when compared with the values at rest and can increase up to 100%. Therefore, this study tried to explain why this increase can occur without compromising the functioning of the organs. The issue is relevant because, during exercise, the ammonia concentration reaches 150  $\mu\text{M}$ ; if an individual presented this ammonia concentration at rest, that hyperammonemia would be considered a pathological state. It is speculated that lactate is essential to protect the organism from the excess ammonia, influencing the metabolism of nitrogenous compounds. To test the hypothesis, we used adult male Wistar rats weighing 300 g. The rats were submitted to the implantations of a cerebral guide cannula and of a cannula into the jugular vein. After recovery from surgery, the animals were submitted to the experimental conditions: the exercise speed of 21  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  or 60 minutes of rest in their cage at a room temperature of 25  $^{\circ}\text{C}$ . Each animal was subjected to four experimental conditions with 48-hour interval: central injection of saline, or ammonia, or lactate or ammonia more lactate. We found a higher concentration of lactate and ammonia in the group that underwent the exercise compared to the rest. The ICV injection caused an increase in lactate concentration in minute 15 (4.4  $\pm$  0.2 mM) and in the voluntary interruption of effort (5.4  $\pm$  0.2 mM) compared to the control situation (15 min 3.3  $\pm$  0.3 mM,  $P = 0.01$ ; IVE 4.3  $\pm$  0.3 mM,  $P = 0.007$ ), the ammonia situation (15 min 3.5  $\pm$  0.2 mM,  $P = 0.002$ ; IVE 3.2  $\pm$  0.2 mM,  $P < 0.001$ ) and ammonia plus lactate situation (15 min 3.6  $\pm$  0.3 mM,  $P = 0.04$ ; IVE 3.9  $\pm$  0.3 mM,  $P < 0.001$ ) and a lower concentration of ammonia in minute 5 and in the voluntary interruption of effort compared to the control situation (min 5  $P = 0.02$ ; IVE  $P < 0.001$ ). Thus, the ammonia concentration in the voluntary interruption of effort in rats did not differ from those found in pathological cases, but there was no damage to the organism, since the lactate reduced the effects of hyperammonemia.

**Keywords:** Rats. Amino Acids. Substrate Energy. Neutralization. Purine Nucleotide Cycle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 - Hidrólise de ATP.....  | 17 |
| FIGURA 2 - Esquema de desaminação de proteínas.....   | 18 |
| FIGURA 3 - Estágios de formação da ureia.....   | 19 |
| FIGURA 4 - Equação de formação da ureia.....  | 20 |
| FIGURA 5 - Diagrama esquemático no metabolismo de alanina, prolina e glutamina relacionado com amônia.....  | 21 |
| FIGURA 6 - Representações esquemáticas do transporte e utilização de lactato nos astrócitos e neurônios.....  | 25 |
| FIGURA 7 - Representação esquemática da elevação da formação dos neurotransmissores GABA e glutamato na via de atenuação do aumento da concentração de amônia.....                                | 26 |
| FIGURA 8 - Protocolo de familiarização ao exercício na esteira rolante.....   | 34 |
| FIGURA 9 - Representação do delineamento experimental 1 – Curva dose-resposta – Grupo 1 e Grupo 2.....  | 38 |
| FIGURA 10 - Representação do delineamento experimental 2 – Grupo 3.....   | 41 |
| FIGURA 11 - Representação esquemática do delineamento experimental 2 – Grupo 4.....   | 42 |
| FIGURA 12 - Esquema da hipótese do presente estudo.....   | 73 |
| GRÁFICO 1 - Concentração plasmática de glicose em mg/dL (A) e concentração plasmática de lactato em mM (B) antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central durante o repouso.....           | 45 |
| GRÁFICO 2 - Concentração plasmática de ureia em mg/dL (A) e concentração plasmática de proteínas totais em mg/dL (B) antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central durante o repouso..... | 47 |
| GRÁFICO 3 - Concentração plasmática de glicose em mg/dL (A) e concentração plasmática de lactato em mM (B) antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central durante o repouso.....           | 49 |
| GRÁFICO 4 - Concentração plasmática de ureia em mg/dL (A) e concentração plasmática de proteínas totais em mg/dL (B) antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central durante o repouso..... | 51 |
| GRÁFICO 5 - Concentração plasmática de glicose em mg/dL (A) e concentração plasmática de lactato em mM (B) antes (min 0), após 5, 15 e 20 minutos da injeção central durante o                    |    |

|   |    |
|---|----|
| repouso.....  | 53 |
| GRÁFICO 6 - Concentração plasmática de amônia em $\mu\text{M}$ antes (min 0), após 5, 15 e 20 minutos da injeção central durante o repouso.....   | 55 |
| GRÁFICO 7 - Concentração de glutamato em mM antes (min 0), após 5 e 20 minutos da injeção central durante o repouso.....  | 56 |
| GRÁFICO 8 - Concentração plasmática de glicose em mg/dL (A) e concentração plasmática de lactato em mM (B) durante o exercício físico, antes (min 0) da injeção central, após 5, 15 e na interrupção voluntária do esforço..... | 57 |
| GRÁFICO 9 - Concentração de amônia em $\mu\text{M}$ durante o exercício físico, antes (min 0) da injeção central, após 5 minutos e na interrupção voluntária do esforço.....  | 59 |
| GRÁFICO 10 - Concentração de glutamato em mM durante o exercício físico, antes (min 0) da injeção central, após 5 minutos e na interrupção voluntária do esforço.....   | 60 |
| GRÁFICO 11 - Tempo total de exercício.....  | 61 |

## LISTA DE TABELA

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 - Protocolo experimental 1- Curva dose-resposta.....   | 38 |
| TABELA 2 - Protocolo experimental 2 – grupo 3.....  | 40 |
| TABELA 3 - Protocolo experimental 2 – grupo 4.....  | 42 |
| TABELA 4 - Concentração de LDH em U/L antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central na situação que recebeu salina (controle) ou amônia.....  | 48 |
| TABELA 5 - Concentração de LDH em U/L antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central na situação que recebeu salina (controle) ou lactato..... | 52 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

|  |   |
|--|---|
| °C: graus celsius  | ICV: injeção intracerebroventricular          |
| Ace-CoA: acetil-CoA  | IMP: inosina monofosfato                      |
| ADP: adenosina difosfato   | IVE: interrupção voluntária do esforço        |
| Ala: alanina   | Lac: lactato                                  |
| ALAT: alanina aminotransferase   | LDH: lactate desidrogenase                    |
| AM: Amônia na dose 300 mM  | Leu: leucina                                  |
| AM 50: Amônia na dose 50 mM  | MCT: transportadores monocarboxilados         |
| AM 450: Amônia na dose 450 mM  | min: minutos                                  |
| AM 750: Amônia na dose 750 mM  | mV: milivolts                                 |
| AM mais LAC: Amônia na dose 300 mM<br>mais Lactato na dose 2 mM          | mA: miliamperes                               |
| AMP: adenosina monofosfato   | O <sub>2</sub> : oxigênio                     |
| ANOVA: análise de variância  | OAA: oxalacetato                              |
| ATP: adenosina trifosfato  | PAG: fosfato glutaminase                      |
| Ca: Cálcio   | PC: piruvato carboxilase                      |
| CEBIO: Centro de Bioterismo do Instituto<br>de Ciências Biológicas       | PFK: fosfofrutoquinase                        |
| CETEA: Comitê de Ética de<br>Experimentação Animal                       | Pyr: piruvato                                 |
| CPN: ciclo da purina nucleotídeo   | SAL: salina                                   |
| EH: Encefalopatia Hepática   | SNC: sistema nervoso central                  |
| EEFFTO: Escola de Educação Física,<br>Fisioterapia e Terapia Ocupacional | T <sub>amb</sub> : temperatura ambiente       |
| g: grama   | TCA: ciclo tricarboxílico                     |
| GABA: gama-aminobutíricoácido  | URA: umidade relativa do ar                   |
| GDH: glutamato desidrogenase   | UFMG: Universidade Federal de Minas<br>Gerais |
| Glc: glicose   | W: watt                                       |
| Gln: glutamina   | $\alpha$ -KG, $\alpha$ -cetoglutarat          |
| Glu: glutamato   |   |
| GS: glutamina sintetase  |   |
| h: hora  |   |

## SUMÁRIO

|            |   |    |
|------------|---|----|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 17 |
| <b>1.1</b> | <b>Revisão de Literatura</b> .....  | 17 |
| 1.1.1      | <u>Amônia</u> .....   | 17 |
| 1.1.2      | <u>Lactato</u> .....  | 22 |
| 1.1.3      | <u>Amônia e Lactato</u> .....   | 24 |
| <b>1.2</b> | <b>Objetivo</b> .....   | 28 |
| <b>2</b>   | <b>MÉTODOS</b> .....  | 29 |
| <b>2.1</b> | <b>Cuidados Éticos</b> .....  | 29 |
| <b>2.2</b> | <b>Animais</b> .....  | 29 |
| <b>2.3</b> | <b>Cálculo amostral</b> .....   | 30 |
| <b>2.4</b> | <b>Manipulação das substâncias</b> .....  | 30 |
| <b>2.5</b> | <b>Delineamento experimental</b> .....  | 32 |
| 2.5.1      | <u>Procedimentos cirúrgicos</u> .....   | 32 |
| 2.5.1.1    | Implante de cânula guia cerebral e cânula na veia jugular.....                                | 32 |
| 2.5.2      | <u>Familiarização ao exercício físico na esteira rolante</u> .....                            | 34 |
| 2.5.3      | <u>Procedimentos experimentais de repouso</u> .....   | 34 |
| 2.5.4      | <u>Procedimentos experimentais de exercício até a interrupção voluntária do esforço</u> ..... | 35 |
| 2.5.5      | <u>Procedimentos pós-experimentais de eutanásia</u> .....                                     | 35 |
| 2.5.6      | <u>Protocolo experimental 1 – Curva dose-resposta em repouso – Grupo 1 e Grupo 2</u> .....    | 36 |
| 2.5.6.1    | Delineamento experimental 1 – Curva dose-reposta em repouso – Grupo 1 e Grupo 2.....          | 38 |
| 2.5.7      | <u>Protocolo experimental 2 – Grupo 3</u> .....   | 38 |
| 2.5.7.1    | Delineamento Experimental 2 – Grupo 3.....  | 41 |
| 2.5.8      | <u>Experimento Exercício – Grupo 4</u> .....  | 41 |
| 2.5.8.1    | Delineamento Experimental 2 – Grupo 4.....  | 42 |
| 2.5.9      | <u>Variáveis</u> .....  | 42 |
| 2.5.9.1    | Variáveis independentes.....  | 42 |
| 2.5.9.2    | Variáveis dependentes.....  | 43 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.5.9.3 Variáveis de controle.....  | 43        |
| <b>2.6 Análise Estatística.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>3 RESULTADOS.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>3.1 Resultados do experimento 1 – Curva dose-resposta – Grupo 1.....</b>   | <b>45</b> |
| 3.1.1 <u>Efeitos da injeção ICV de salina ou de amônia sobre a concentração plasmática de glicose e de lactato durante o repouso.....</u>                 | 45        |
| 3.1.2 <u>Efeitos da injeção ICV de salina ou de amônia sobre a concentração plasmática de ureia, de proteínas totais e de LDH durante o repouso.....</u>  | 47        |
| <b>3.2 Resultados do experimento 1 – Curva dose-resposta - Grupo 2.....</b>   | <b>49</b> |
| 3.2.1 <u>Efeitos da injeção ICV de salina ou de lactato sobre a concentração plasmática de glicose e de lactato durante o repouso.....</u>                | 49        |
| 3.2.2 <u>Efeitos da injeção ICV de salina ou de lactato sobre a concentração plasmática de ureia, de proteínas totais e de LDH durante o repouso.....</u> | 51        |
| <b>3.3 Resultados do experimento 2 – Grupo 3.....</b>   | <b>53</b> |
| 3.3.1 <u>Efeitos da injeção ICV sobre a concentração plasmática de glicose e de lactato durante o repouso.....</u>  | 53        |
| 3.3.2 <u>Efeitos da injeção ICV sobre a concentração plasmática de amônia durante o repouso.....</u>  | 55        |
| 3.3.3 <u>Efeitos da injeção ICV sobre a concentração sorológica de glutamato durante o repouso.....</u>   | 56        |
| <b>3.4 Resultados do experimento 2 – Grupo 4.....</b>   | <b>57</b> |
| 3.4.1 <u>Efeitos da injeção ICV sobre a concentração plasmática de glicose e de lactato durante o exercício físico.....</u>                               | 57        |
| 3.4.2 <u>Efeitos da injeção ICV sobre a concentração plasmática de amônia durante o exercício físico.....</u>   | 59        |
| 3.4.3 <u>Efeitos da injeção ICV sobre a concentração sorológica de glutamato durante o exercício físico.....</u>  | 60        |
| 3.4.4 <u>Efeitos da injeção ICV no tempo total de exercício.....</u>  | 61        |
| <b>4 DISCUSSÃO.....</b>   | <b>62</b> |
| <b>4.1 Alteração na concentração plasmática de amônia.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>4.2 Alteração na concentração plasmática de lactato.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>4.3 Alteração na concentração plasmática de amônia e lactato.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>   | <b>75</b> |

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>     | <b>76</b> |
| <b>ANEXO 1 – CETEA.....</b> | <b>90</b> |



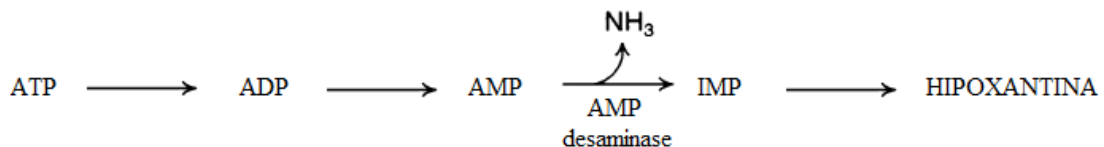
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Revisão de Literatura

### 1.1.1 Amônia

Nos anos 1920s, Parnas e Mozolowski encontraram uma relação entre a formação de amônia no músculo esquelético e a degradação de nucleotídeos (PARNAS; MOZOLOWSKI, 1927). Atualmente, sabe-se que a formação de amônia ( $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ ) ocorre durante a hidrólise de ATP (ZHAO *et al.* 2000) e na desaminação, que possibilita a utilização de aminoácidos como doadores de carbono (LEMON; MULLIN, 1980; WAGENMAKERS *et al.* 1991).

O aumento da produção de amônia ocorre principalmente durante o exercício físico, pois as vias de transformação de energia têm seu fluxo aumentado para atenderem à demanda por ATP (VAN HALL *et al.* 1995). A maior demanda energética exigida faz com que a taxa de hidrólise de ATP exceda a taxa de refosforilação do ADP e do AMP. Dessa forma, há maior conversão de AMP em IMP e assim, elevação da produção de amônia no músculo esquelético em contração quando comparado com o repouso (TERJUNG *et al.* 1992). Essa última reação é catalisada pela enzima adenilato desaminase (LOWENSTEIN, 1972), como esquematizado na FIG. 1.



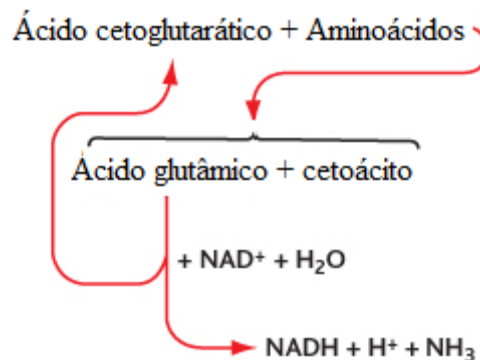
**FIGURA 1** - Hidrólise de ATP: representação esquemática da principal fonte de produção de amônia (VAN HALL *et al.* 1995).

Muitos estudos têm mostrado que a amônia é produzida pelo músculo esquelético na conversão do AMP em IMP (KATZ *et al.* 1986 a; KATZ *et al.* 1986 b) durante exercício de curta duração e alta intensidade ou exercício prolongado e submáximo (MIEYER; TERJUNG, 1979). Além disso, Broberg e Sahlin (1989) estudaram indivíduos que se

exercitaram com baixa concentração de glicogênio muscular e observaram hiperamonemia plasmática, pois ocorre maior formação de IMP e de  $\text{NH}_3$  nessa condição.

Durante o exercício físico, o gasto energético cresce com o aumento da intensidade e/ou duração. Para suprir o aumento da demanda energética, os aminoácidos podem ser usados como fonte de energia, mas antes precisam ser desaminados ou convertidos em carboidrato ou lipídios (KADOWAKI *et al.* 2003). Esse processo acontece principalmente no fígado, porém uma pequena parcela da desaminação pode ocorrer nos rins (VAN DE POLL *et al.* 2004).

Durante a desaminação, o grupo amino do aminoácido é transferido para o ácido cetoglutarático, o qual se transforma, então, em ácido glutâmico. Em seguida, o ácido glutâmico poderá ainda transferir o grupo amino para outras substâncias ou liberá-lo em forma de amônia (ALTENBERG, 2003), como mostrado na FIG. 2 (GUYTON; HALL, 2006).



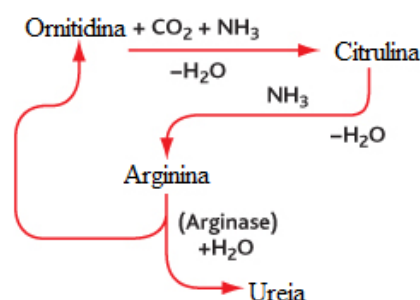
**FIGURA 2** - Esquema mostrando a desaminação das proteínas. O grupo amino do aminoácido é transferido para o ácido cetoglutarático, o qual se transforma então em ácido glutâmico. Em seguida, o ácido glutâmico poderá ainda transferir o grupo amino para outras substâncias ou liberá-lo em forma de amônia (GUYTON; HALL, 2006).

Entretanto, a principal via de hiperamonemia ocorre quando o glutamato é convertido em  $\alpha$ -cetogluturato, pois produz duas moléculas de amônia, em uma reação catalisada pela enzima glutamato desidrogenase (CAPIAUMONT *et al.* 1995; MCLIMANS *et al.* 1991). Snow *et al.* (2000) estudaram indivíduos que se exercitaram por mais de duas horas em uma intensidade moderada ( $\sim 60\% \text{VO}_{2\text{max}}$ ) e observaram aumento da produção de amônia possivelmente pelo aumento da oxidação de aminoácidos, o que possibilitou a gliconeogênese nas células hepático.

Portanto, a produção de amônia é catalisada principalmente por duas enzimas: a glutamato desidrogenase, encontrada exclusivamente no compartimento intramitocondrial e a adenilato desaminase localizada predominantemente fora das mitocôndrias (LOWENSTEIN, 1972). Essas enzimas são encontradas em grande concentração no fígado e em menor quantidade nos rins e no cérebro (WILLIAMSON *et al.* 1967.), já que nesses órgãos ocorre formação de IMP e existe a possibilidade do uso de aminoácidos como substrato energético (PURZYCKA, 1962).

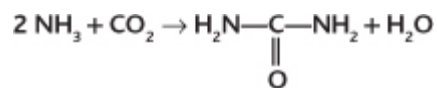
A amônia formada é transportada ligada ao glutamato ou é encontrada no sangue principalmente na sua forma  $\text{NH}_4^+$ . A urina excretada pelos rins, os órgãos e o conteúdo intracelular possuem diferentes valores de pH, os quais irão o equilíbrio entre as concentrações de  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$ . Em um sistema mais alcalino, a forma não dissociada da amônia ( $\text{NH}_3$ ) é transportada de forma mais eficiente. Ao contrário, a forma  $\text{NH}_4^+$  é a mais encontrada no plasma, que possui pH em torno de 7,4, ou em locais mais ácidos (rins, lisossomas e sinaptossomas). As mudanças nas concentrações extracelulares de  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_4^+$  exigem adaptações compensatórias para manter o pH e o organismo depende necessariamente da sua capacidade de tamponamento (BACHMANN, 2000).

Para eliminar a amônia produzida no metabolismo (FIG. 3), a mitocôndria dos hepatócitos sintetiza ureia (ALISON *et al.*, 2002). Grandes quantidades de amônia são formadas no fígado pelo processo de desaminação e, por consequência, se esse órgão não formar ureia, a concentração plasmática de amônia se elevará rapidamente, podendo resultar em coma hepático e até morte (SANDS, 2003). Outro processo que leva à diminuição da concentração de amônia também no fígado é a formação de 90% de todas as proteínas plasmáticas, em uma taxa de 15 a 50 g/dia e a síntese de aminoácidos não essenciais (ALISON *et al.*, 2002).



**FIGURA 3** - Estágios da formação da ureia. Após a sua formação, a ureia se difunde a partir dos hepatócitos para os fluidos corporais, sendo excretada nos rins (GUYTON; HALL, 2006).

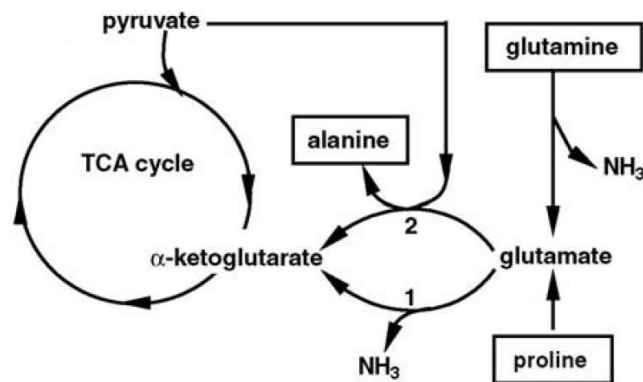
No momento em que ocorre um acréscimo na concentração plasmática de amônia, o fígado responde aumentando a velocidade do ciclo da ureia (BACHMANN, 2002). Este ciclo requer quatro ATP para excretar duas moléculas de amônia, através dos rins. Como a ureia é uma substância muito menos tóxica que a amônia, pode ser acumulada temporariamente no corpo e excretada em soluções concentradas, sem que haja grande perda de água pelo organismo (GUYTON; HALL, 2006).



**FIGURA 4** - A amônia é removida do sangue quase inteiramente através de sua conversão para ureia. Duas moléculas de amônia e uma molécula de dióxido de carbono se combinam de acordo com a equação descrita acima (GUYTON; HALL, 2006).

Porém, durante o exercício físico, ocorre aumento da concentração de amônia que é rapidamente revertido ao final do mesmo. Os valores encontrados são extremamente elevados ao se comparar com os valores durante o repouso; chegam a ser 100% superiores (GRAHAM *et al.* 1987; CARVALHO-PREIXOTO *et al.* 2007; ALMEIDA *et al.* 2010; WILKINSON *et al.* 2010). A síntese da ureia não pode ser responsável pela remoção completa da amônia produzida. O fato de que a concentração plasmática de amônia pode ultrapassar 150  $\mu\text{M}$  durante o exercício (KATZ *et al.* 1986 a; HELLSTEN *et al.* 1999) e que essa concentração seria considerada patológica se o indivíduo estivesse em repouso (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002) levou à pergunta central do presente estudo. É relevante investigar porque é possível atingir concentrações tão elevadas de amônia sem o comprometimento do funcionamento dos órgãos.

Outros aminoácidos também podem diminuir a concentração da amônia, como a alanina e a prolina. Especificamente, o acréscimo de prolina permite a sua conversão direta em  $\alpha$ -cetogluturato, gerando apenas uma molécula de amônia. Em contraste, a desaminação de glutamina em  $\alpha$ -cetogluturato libera duas moléculas de amônia. Assim, a prolina substitui metabolicamente a glutamina, aumentando o fluxo glicolítico no ciclo do ácido cítrico com uma menor produção do metabólito (CHEN; HARCUM, 2005). A alanina, por sua vez, consegue carregar o grupo amônia produzido na conversão de glutamato em  $\alpha$ -cetogluturato (HASSEL; BUTLER, 1990; CHEN; HARCUM, 2005), como mostrado na FIG. 5.



**FIGURA 5** - Diagrama esquemático que mostra as relações entre a amônia e o metabolismo de alanina, prolina e glutamina. A primeira via sinalizada (1) evidencia a formação de  $\alpha$ -cetoglutarato e produção de amônia, enquanto a segunda via (2) mostra como é possível essa formação de  $\alpha$ -cetoglutarato sem produção de amônia (CHEN; HARCUM, 2005).

O excesso de amônia que não é catalisada pelas enzimas nos órgãos e nos músculos permanece na corrente sanguínea e pode atravessar a barreira hematoencefálica (BACHMANN, 2002), chegando ao sistema nervoso central (SNC). O SNC não possui ciclo da ureia e assim depende da síntese de glutamina, formada pelo catabolismo de glutamato e amônia, para a remoção do excesso de amônia (SUAREZ *et al.* 2002). A concentração do metabólito em cérebros de ratos é de 0,20 a 0,45  $\mu\text{mol/g}$  (OJA *et al.* 1966) e, em seres humanos, a concentração no fluido cérebro espinhal apresenta valor máximo de 2  $\mu\text{M}$  durante o repouso e de até 6,4  $\mu\text{M}$  durante o exercício (NYBO *et al.* 2005).

Nybo *et al.* (2005) demonstraram que ocorre captação de amônia cerebral, confirmada pelo aumento da concentração da mesma no fluido cérebro espinhal, durante o exercício físico de 2 horas a  $188 \pm 6 \text{ W}$ , que correspondeu à  $\sim 60\%$  do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ . Foi observado também que aqueles indivíduos com maior concentração do metabólito apresentaram maior percepção subjetiva do esforço, indicando que o aumento da concentração de amônia pode influenciar na interrupção do esforço (NYBO *et al.* 2005).

Jayakumar *et al.* (1997) observaram uma correlação entre o aumento da concentração cerebral de amônia e a inibição da atividade locomotora espontânea ou a perda da coordenação motora em ratos, após injeções intraperitoneais de cloreto de amônia e acetato de amônia em diferentes concentrações: 100, 200, 400 e 800 mg/kg. Foi constatado também que concentrações elevadas de amônia inibem a utilização de glicose no SNC.

A hiperamonemia plasmática em indivíduos, em repouso, é considerada uma das principais causas de distúrbio psicológico em casos como fibrose hepática e doença hepática crônica (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002). Modelos experimentais desenvolvidos em cães e, mais tarde, estudos com pacientes humanos, observaram que o aumento da concentração de amônia muitas vezes é acompanhado por disfunção neuropsicológica sob a forma de Encefalopatia Hepática (EH). Isso levou muitos pesquisadores a concluírem que a amônia desempenha um papel patogênico no organismo (KATAYAMA, 2004). Os sintomas associados à hiperamonemia nos casos patológicos citados não são encontrados durante o exercício, mesmo quando é alcançada a mesma concentração de amônia.

A hipótese levantada para execução do presente estudo é que o estado de hiperamonemia encontrado durante a atividade física só é possível, provavelmente, devido à presença de outro metabólito protetor, o lactato. O mesmo poderia contrabalancear os efeitos da hiperamonemia no metabolismo energético no músculo (WIECHETEK *et al.* 1981; HASSEL *et al.* 1991; OZTURK *et al.* 1992; CHEN; HARCUM, 2005) e no SNC (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994; BAK *et al.* 2006), a fim de diminuir a concentração de amônia.

### 1.1.2 Lactato

O lactato foi estudado pioneiramente no músculo pelos pesquisadores Otto Meyehorff e Archibald V. Hill em 1922. Meyehorff postulou que o ácido láctico era produzido na ausência de oxigênio, enquanto Hill quantificou a energia liberada pela glicose durante a sua conversão a ácido láctico. Atualmente, contesta-se a ideia de que o lactato cause acidose e fadiga ou que o fluxo glicolítico seja regulado pela presença de O<sub>2</sub>. Ademais, estudos recentes mostram que o lactato é um importante substrato celular em situações de demanda metabólica elevada, como as que acontecem durante o exercício (MILLER *et al.* 2002; ROBERGS *et al.* 2004).

A produção de lactato é influenciada pela captação de glicose, fluxo glicolítico, glicogenólise, reservas de glicogênio e intensidade do exercício (PAROLIN *et al.* 2000; BLOMSTRAND; SALTIN, 1999). O aumento da demanda energética nas células regula diversas enzimas, entre elas a enzima fosfofrutoquinase (PFK), cuja atividade é regulada pelas concentrações de ATP,

$\text{NH}_4^+$ , frutose 1,6-bifosfato, frutose 2,6-fosfato, AMP,  $\text{P}_i$ ,  $\text{H}^+$  e citrato. A PFK é uma enzima reguladora importante reguladora do fluxo glicolítico (BOSCÁ *et al.* 1985; OGUSHI *et al.* 1990). Além disso, a enzima glicogênio fosforilase e a enzima piruvato desidrogenase (PDH) também influenciam a produção de lactato e são reguladas pela concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo (HOWLETT *et al.* 1998).

O aumento do fluxo glicolítico observado durante o exercício leva ao aumento em conjunto da concentração de piruvato, da hidrólise de ATP, da formação de acetil-CoA e de NADH que favorecem à formação de lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH) (SAHLIN *et al.* 1987; HOWLETT *et al.* 1998). Foi demonstrado também que o lactato não é convertido previamente em glicose antes de ser oxidado, sugerindo que pode haver uma via direta de oxidação do mesmo (PÉRONNET *et al.* 1997). Além disso, a maior disponibilidade de lactato pode reduzir a captação de glicose por reduzir a expressão de GLUT4 no músculo esquelético (LOMBARDI *et al.* 1999).

O lactato é um precursor importante da gliconeogênese durante o aumento da demanda energética e serve como substrato energético, além de retardar a acidose muscular (SHURR *et al.* 1999; PERRIELO *et al.* 1995; ROBERGS *et al.* 2004). Pode também contribuir para a redução da secreção de insulina, pois induz aumento da gliconeogênese e da produção hepática de glicose (CHOI *et al.* 2002; MILLER *et al.* 2002; ROEF *et al.* 2003).

A remoção e captação de lactato nas membranas são realizadas pelos transportadores monocarboxilados (MCTs), os quais desempenham um papel fundamental no tamponamento de prótons (GREEN *et al.* 2002; TOUNOCHI *et al.* 2002; THOMAS *et al.* 2005). Indivíduos que foram submetidos a um treinamento de 8 dias, com sessões diárias de 2 horas de exercício em ciclo ergômetro à 60% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ , apresentaram aumento da captação de lactato como consequência do aumento de MCT1 no músculo esquelético (BONEN *et al.* 1998; GREEN *et al.* 2002).

O lactato sanguíneo atravessa a barreira hematoencefálica através dos transportadores monocarboxílicos e em proporção à sua concentração arterial. No SNC, os neurônios expressam predominantemente a isoforma MCT2, enquanto os astrócitos expressam MCT1 e MCT4 (BALMACEDA-AGUILERA *et al.* 2012). O MCT2 é um transportador de alta afinidade e possui baixa velocidade (RAE *et al.* 2009), enquanto os MCT1 e MCT4 são de

baixa afinidade e possuem alta velocidade (SUZUKI *et al.* 2011). Isso capacita os astrócitos de transportar o lactato rapidamente à medida que o mesmo é produzido.

Durante o repouso, a concentração de lactato no fluido extracelular cerebral (em torno de 1,4 mM) é maior que a arterial, e esse valor é maior que a concentração de glicose no mesmo local (ABI-SAAB *et al.* 2002). Bouzier-Sore *et al.* (2006) relataram que com uma concentração de 1,1 mM *in vitro*, o lactato é responsável por 46% do metabolismo oxidativo neuronal. A contribuição do lactato atingiu valores ainda maiores com o aumento de sua concentração, chegando a 93% quando sua concentração era de 11 mM.

Entretanto, durante a atividade física a concentração plasmática de lactato pode alcançar valores maiores que 15 mM. A diferença artério-venosa de lactato varia de acordo com as características da atividade física, podendo ir de valores como -0,08 a 1,34 mM (DALSGAARD, 2006).

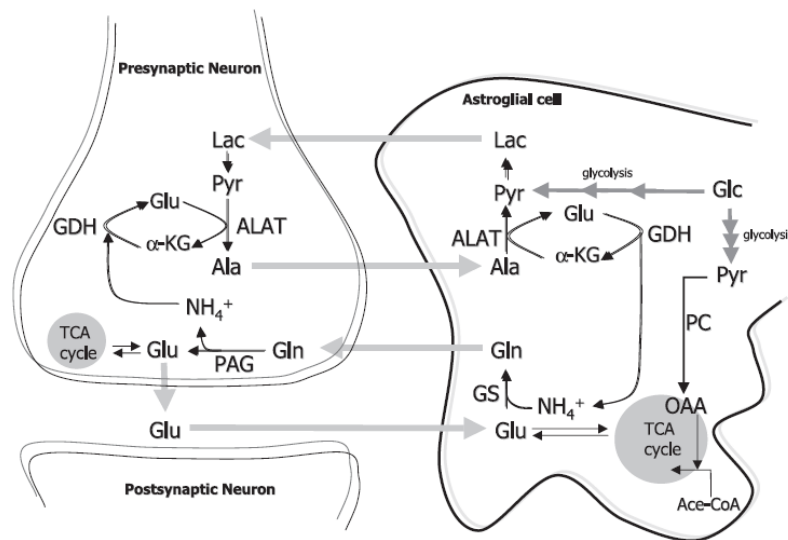
O aumento da concentração de lactato parece ser um importante achado para a conversão de energia e é possível especular que promova também uma ação protetora na agressão ao sistema nervoso central (DALSGAARD, 2004). Como o exercício físico induz um aumento na demanda energética, o lactato é utilizado como substrato tanto no músculo como no SNC, capaz de manter a atividade neuronal e influenciar a continuidade do exercício (MILLER *et al.* 2002; FATTOR *et al.* 2004).

### 1.1.3 Amônia e lactato

Durante o exercício físico, ocorre aumento sistêmico tanto da concentração de lactato quanto de amônia. Ambos os metabólitos são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica (BOUZIER *et al.* 2000) e proporcionar alteração no metabolismo cerebral. Em 1994, foi identificado um mecanismo de utilização e transporte de lactato e amônia no SNC, mais especificamente entre astrócitos e neurônios, denominado “Lançadeira de Lactato Astrócito-Neurônio”, porém essa via só foi comprovada *in vitro*.



Esse mecanismo inicia-se com a utilização de glicose como substrato energético nos astrócitos e, do mesmo modo que ocorre no músculo esquelético, há uma maior formação de lactato, de acordo com a disponibilidade de energia. O lactato, por sua vez, é transportado para o meio extracelular e captado pelos neurônios. Visto que os neurônios não realizam gliconeogênese, o lactato é convertido em piruvato, o qual entra no ciclo do ácido cítrico para oxidação e posterior síntese de ATP (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994), como mostrado na FIG. 6 (BAK *et al.* 2006).



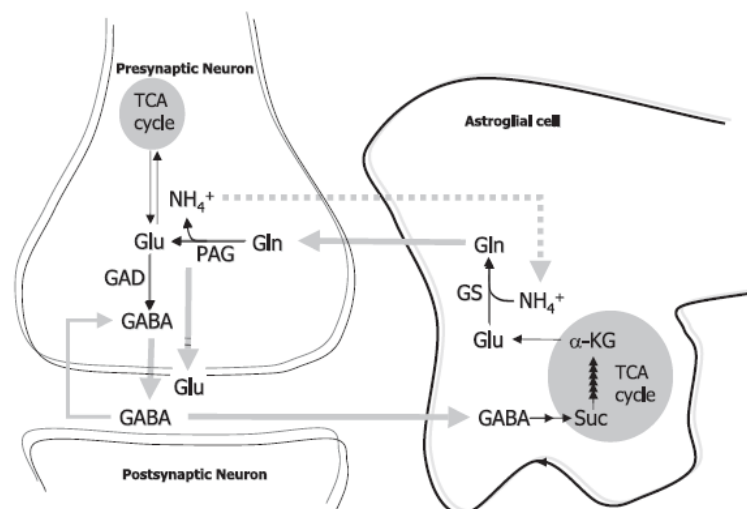
**FIGURA 6** - Representações esquemáticas do transporte e utilização de lactato nos astrócitos e neurônios. O lactato pode ser convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato que ao recombinar com a amônia produzida nos neurônios, pela reação catalisada pela enzima GDH, forma glutamato. Em seguida, o glutamato é transaminado pela ALAT que converte o piruvato, derivado do lactato, em alanina. Posteriormente, a alanina é transportada para os astrócitos. Nos astrócitos este processo é, então, invertido, ocorre formação de lactato, porém deve-se observar que alanina e lactato não são transportados nas mesmas quantidades. Abreviações: Ace-CoA, acetil-CoA; Ala, alanina; ALAT, alanina aminotransferase;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cetoglutarato; GDH, glutamato desidrogenase; Glc, glicose; Gln, glutamina; Glu, glutamato; GS, glutamina sintetase; Lac, lactato; Leu, leucina; OAA, oxalacetato; PAG, fosfato glutaminase; PC, piruvato carboxilase; Pyr, piruvato; TCA, ciclo tricarbóxico (BAK *et al.* 2006).

No neurônio, o lactato pode ser convertido em piruvato ou em  $\alpha$ -cetoglutarato, que, ao se ligarem à amônia, formam alanina e glutamato, respectivamente (SUAREZ *et al.* 2002; CHEN; HARCUM, 2005; BAK *et al.* 2006). Um fato importante é que a conversão de lactato em piruvato ocorre por diferentes isoformas da enzima LDH: os neurônios expressam preferencialmente a isoforma LDH1 e os astrócitos expressam preferencialmente a LDH5 (O'BRIEN *et al.* 2007).

O'Brien *et al.* (2007) avaliaram que a isoforma encontrada nas sinapses neuronais está de acordo com a maior utilização do lactato como substrato e que, a isoforma encontrada nos astrócitos, favorecendo maior produção de lactato. Além disso, o aumento da concentração dos substratos induz maior atividade da enzima em ambas as direções da reação (piruvato ↔ lactato). Assim, concentrações elevadas de lactato, como durante o exercício físico moderado a intenso, favorecem a captação e oxidação do lactato nos neurônios.

A via entre neurônios e astrócitos só é possível se houver lactato disponível para ser convertido em piruvato ou  $\alpha$ -cetogluturato, que, ao receberem o grupo amônio, são convertidos em alanina, glutamina ou glutamato e são transportados para o astrócitos, como explicado anteriormente. Como durante a atividade física ocorre o aumento da produção tanto de amônia quanto de lactato, é possível que o lactato seja imprescindível para tamponar o excesso de amônia, influenciando no metabolismo dos compostos nitrogenados.

A maior produção de glutamato formada nessa via pode, por um lado, atenuar o aumento da concentração de amônia no SNC, porém pode causar ocasionar também um desequilíbrio nos neurotransmissores, como mostrado na FIG. 7 (BAK *et al.* 2006). A hiperamonemia plasmática encontrada em casos patológicos (BAK *et al.* 2006) e também durante o exercício (BANISTER; CAMERON, 1990) está associada à alteração na regulação dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, a qual é suficiente para causar excitotoxicidade neural (CAULI *et al.* 2006).



**FIGURA 7-** Representação esquemática da maior formação dos neurotransmissores GABA e glutamato na via de atenuação do aumento da concentração de amônia. Abreviações: Ace-CoA, acetil-CoA;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cetogluturato; Gln, glutamina; Glu, glutamato; GS, glutamina sintetase; PAG, fosfato glutaminase; TCA, ciclo tricarbóxico (BAK *et al.* 2006).

O aumento da concentração de glutamato pode não ser benéfico para o neurônio (CAULI *et al.* 2006) e, portanto, é necessária a presença de lactato para contrapor esse efeito. O papel neuroprotetor do lactato é atribuído à sua habilidade de aumentar a demanda energética dos neurônios expostos a concentrações elevadas de glutamato (ROS *et al.* 2001). *In vitro*, a adição de 4 mM de *L-lactato* em fatias do hipocampo, logo após a privação de oxigênio e glicose, promoveu proteção contra a morte neuronal, ao passo que uma dose mais elevada de 20 mM foi tóxica. *In vivo*, após oclusão da artéria cerebral nos ratos, uma injeção ICV de 2  $\mu$ L de 100 mM de *L-lactato*, levou a uma diminuição significativa no tamanho da lesão (BERTHET *et al.* 2009).

Considerando todas as evidências apresentadas anteriormente, no presente estudo, buscamos avaliar o metabolismo das proteínas totais, incluindo as alterações nas concentrações de glutamato e a produção de amônia e lactato. Assim, tentamos estabelecer uma relação entre aumento na produção de amônia no exercício e o uso de lactato como substância protetora contra este aumento. A pergunta central é se o lactato injetado intracerebroventricularmente pode diminuir a concentração de amônia *in vivo*, protegendo o SNC dos efeitos deletérios desse composto nitrogenado.

## **1.2 Objetivo**

O objetivo deste estudo é analisar os efeitos do lactato central sobre o metabolismo de amônia durante o exercício físico.

## 2 MÉTODOS

### 2.1 Cuidados Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA - 236/2010 - ANEXO 1) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e, todos os procedimentos propostos estão de acordo com o guia para conduta ética no cuidado e uso de animais

### 2.2 Animais

Foram utilizados ratos adultos da linhagem *Wistar*, pesando  $300 \pm 15$  gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE) da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional (EEFFTO) da UFMG em uma sala mantida à temperatura ambiente de aproximadamente 25° C, por meio de um ar condicionado e sob ciclo claro-escuro de 14,00 – 10,00 horas (h), sendo as luzes acessas às 5,00 h. Inicialmente, os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 6 animais e, após a cirurgia, foram transferidos para gaiolas individuais. As gaiolas foram forradas com maravalha e os ratos tiveram acesso livre à ração granulada (Nuvilab) e água tratada (COPASA).

Entre as fases de aprendizagem (grupo piloto) e o experimento, foram utilizados 197 ratos. Os principais motivos para perda de animais e experimentos foram: o animal não corria na esteira rolante; não era possível coletar sangue dos animais, devido a problemas no cateter implantado na veia jugular; o capacete de acrílico que fixava as cânulas ao crânio soltou durante o experimento e erros na cirurgia.

### 2.3 Cálculo amostral

Para o cálculo amostral demonstrado abaixo, utilizou-se a média e o desvio-padrão das concentrações cerebrais de amônia referenciados pela literatura, aqui representado pelo artigo de Muñoz *et al.* (2000), cujo grupo amostral utilizado, composto por ratos *Wistar*, assemelha-se ao do presente estudo. Segundo Muñoz *et al.* (2000), a quantidade de amônia cerebral do grupo controle é  $0,21 \pm 0,04$   $\mu\text{mol/g}$  de tecido.

Como a amônia é a variável mais importante e instável apresentada pelo presente estudo, utilizou-se do valor supracitado, como referência para o cálculo amostral. Essa prática é sustentada pelo fato de que o valor supracitado corresponde ao grupo controle, e, portanto, livre de interferências do tratamento. O cálculo foi realizado fundamentado na fórmula de Sampaio (2007), a qual foram indicou que seriam necessários 8 animais por grupo, aceitando-se uma variação de 20%.

$$x \pm t \ s/\sqrt{n}$$

X= média: 0,21

t= TAB. A2 pág. 225 (SAMPAIO, 2007): 2,0

s= desvio padrão: 0,04

Portanto, para uma variação de 20% teremos:

$$0,0294 = 2(0,04) / \sqrt{n}$$

$$n = [2(0,04)/0,0294]^2$$

$$n = (2,721)^2$$

$$n = 7,40 = 8 \text{ animais}$$

### 2.4 Manipulação das substâncias

Durante os experimentos, foram injetas diferentes concentrações de amônia e lactato. Para manipular a amônia utilizamos cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), reagente para biologia molecular

da marca *Sigma*. A referência do produto é A9434 e a massa molar é 53,49 g. Baseamos nos seguintes cálculos:

$$\begin{aligned} 53,49 \text{ g} &\rightarrow 1000 \text{ mM} \\ X &\rightarrow 750 \text{ mM} \\ X &= 40,12 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 40,12 \text{ g} &\rightarrow 1000 \text{ mL} \\ X &\rightarrow 20 \text{ mL} \\ X &= 0,8 \text{ g} \end{aligned}$$

Assim, foi diluído 0,8 g de cloreto de amônio em um volume de 20 mL de tampão PBS (Mistura de sais para o preparo da solução salina tamponada, pH  $7,2 \pm 0,1$ , marca *Laborclin* produtos para laboratórios) para manipular amônia na concentração de 750 mM. Essa dose foi diluída adicionando PBS para obter as outras doses: 450 mM, 400 mM, 350 mM, 300 mM e 50 mM necessárias para realização dos experimentos. Por exemplo: Adicionamos 466,7 mL de PBS em um volume de 533,3 mL de solução de amônia à 750 mM e obtivemos um volume final de 1000 mL e concentração de amônia igual à 400 mM.

Como relação a manipulação do lactato, utilizamos ácido láctico da marca *Aldrich*. A referência do produto é W261106 e a massa molar é 90,08 g. Baseamos nos seguintes cálculos:

$$\begin{aligned} 90,08 \text{ g} &\rightarrow 1000 \text{ mM} \\ X &\rightarrow 15 \text{ mM} \\ X &= 1,35 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 1,35 \text{ g} &\rightarrow 1000 \\ X &\rightarrow 20 \text{ mL} \\ X &= 27,02 \text{ mg} \end{aligned}$$

Assim, foi diluído 27,02 mg de cloreto de ácido láctico em um volume de 20 mL de tampão PBS para manipular lactato na concentração de 15 mM. Essa dose foi diluída adicionando PBS para obter as outras doses: 8 mM e 2 mM necessárias para realização dos experimentos. Por exemplo: Adicionamos 466,7 mL de PBS em um volume de 533,3 mL de solução de amônia à 15 mM e obtivemos um volume final de 1000 mL e concentração de amônia igual à 8 mM.

## 2.5 Delineamento experimental

O estudo foi estruturado de acordo com o delineamento em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, no qual o bloco foi representado pelo animal e a subparcela pelo tempo ao longo da sessão experimental. Cada animal (bloco) passou por todas as situações previstas no protocolo experimental, o que reduz o coeficiente de variação das variáveis medidas.

### 2.5.1 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (90 mg/kg de massa corporal, i.p.) e Xilazina (10,5 mg/kg de massa corporal, i.p.) e receberam imediatamente antes do início da cirurgia 0,2 mL de antibiótico na dose 48.000 UI/mL (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, via intramuscular), ou seja, 0,1 mL em cada pata traseira e 0,1 mL de analgésico na dose 1,1 mg/kg (Banamine, via subcutânea).

O animal foi pesado antes de cada procedimento cirúrgico e a massa corporal foi utilizada como parâmetro de recuperação do estado de saúde, que correspondeu ao tempo necessário para que o animal retornasse ao peso pré-cirúrgico.

#### 2.5.1.1 Implante de cânula guia cerebral e cateter na veia jugular

Primeiramente, a porção superior da cabeça do animal foi depilada e, após a assepsia, foi realizada uma incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo. Foi realizada a remoção do perióstio para expor o bregma, referência anatômica para as coordenadas estereotáxicas, com o auxílio de uma solução de cloridrato de lidocaína 2 %. Posteriormente, o animal foi posicionado em decúbito ventral, a região da veia jugular foi depilada e um corte de aproximadamente 2 cm foi feito nessa região da pele. Após esse procedimento, a pele foi divulsionada da musculatura e o tecido adiposo foi afastado para expor a veia jugular.



Em seguida, uma agulha em forma de “L” conectada ao cateter de silicone foi inserida na veia jugular (0,59 mm de diâmetro interno x 0,99 mm de diâmetro externo). Essa agulha foi inserida perfurando a veia em dois pontos, um na entrada e outro na saída da agulha, sendo que o último ponto perfurado estava localizado logo abaixo da musculatura do peitoral. A agulha em “L” foi desacoplada do cateter e este foi posicionado aproximadamente 3 cm através da veia jugular direita, até o átrio direito, para a realização das colheitas de sangue (LIMA *et al.* 1999).

Após esses procedimentos, com a seringa conectada a um tubo de polietileno (P50), um pouco de sangue foi aspirado para conferir se o cateter estava posicionado corretamente e, logo em seguida, 0,05 mL da mistura de soro fisiológico estéril com heparina (20 mL de soro fisiológico estéril 0,9 % + 0,1 mL de heparina sódica na dose 5.000 UI/mL) foi injetado para que não ocorresse a coagulação do sangue na luz do cateter.

Em seguida, o animal foi posicionado no estereotáxico para animais de pequeno porte (Insight Equipamentos – modelo ETX3/99, SP, Brasil) para o implante da cânula guia cerebral no terceiro ventrículo e para fixação dois parafusos, um no osso parietal e o outro no osso frontal. A craniotomia para implante da cânula guia de 0,8 mm de diâmetro interno e 20 mm de comprimento (21 gauge) foi feito por meio de uma broca odontológica (Maxi – Oto, Brasil) nas coordenadas: 1,5 mm posterior ao bregma, 2,5 mm a partir da linha mediana e 3,0 mm de profundidade a partir da dura máter (DE GROOT, 1959). O cimento odontológico autopolimerizável (Dental Vip, SP, Brasil) foi aplicado em torno das duas cânulas, a cânula de metal em forma de “L” acoplada ao cateter de silicone da veia jugular e a cânula guia, e em torno dos dois parafusos.

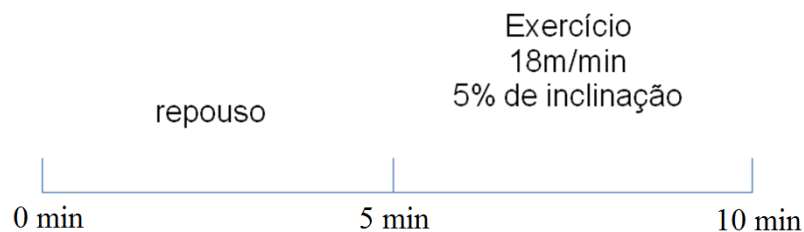
As cânulas tiveram o seu orifício interno protegido com um mandril (0,1 mm de espessura) para evitar obstruções. Para a limpeza do cateter de silicone implantado na veia jugular, foi injetado 0,1 mL de solução de soro fisiológico estéril, contendo heparina e pentabiótico (20 mL de soro fisiológico estéril 0,9 % + 0,1 mL de heparina + 0,1 mL de pentabiótico), todos os dias, sem exceção.

### 2.5.2 Familiarização ao exercício físico na esteira rolante

Após o período de recuperação os animais foram familiarizados a correr em uma esteira rolante para pequenos animais. O protocolo de familiarização foi realizado durante três dias consecutivos, dez minutos por dia. Nos primeiros cinco minutos, a esteira permaneceu desligada e, em seguida, o animal foi submetido a cinco minutos de corrida a 18 m/min e 5% de inclinação, o que correspondeu aproximadamente 67% consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ) (LIMA *et al.* 2001). Durante o protocolo, a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar (URA) foram mantidas em aproximadamente 25° C e 50%, respectivamente.

O protocolo da familiarização ao exercício foi realizado para ensinar ao animal em que direção correr e para que o animal se adaptasse ao ambiente, no qual foram realizadas as situações experimentais.

O protocolo de familiarização ao exercício na esteira rolante está representado na FIG. 8.



**FIGURA 8** - Protocolo de familiarização ao exercício na esteira rolante. FONTE: Produção do próprio autor.

### 2.5.3 Procedimentos experimentais de repouso

Os animais ficaram em repouso durante 60 minutos em suas respectivas caixas. Durante o experimento, a temperatura ambiente e a URA foram mantidas em aproximadamente 25° C e 50%, respectivamente.

#### 2.5.4 Procedimentos experimentais de exercício até a interrupção voluntária do esforço

Os animais correram em uma esteira rolante para pequenos animais (Treadmill Simplex II, Columbus Instruments, EUA), a uma velocidade de 21 m/min e inclinação de 5%, o que corresponde à aproximadamente 75%  $VO_{2\text{máx}}$ . Estudos sugerem que a produção é dependente da intensidade do exercício e que há maior formação de amônia em exercícios de alta intensidade, em torno de 70 a 100% do  $VO_{2\text{máx}}$  (DUDLEY *et al.* 1983; BROBERG; SAHLIN, 1989). Inicialmente, a velocidade escolhida foi de 24 m/min, porém alguns ratos conseguiram correr por 15 minutos, tempo insuficiente para coletar todas as amostras de sangue. Foi necessário então, diminuir a velocidade da esteira para 21 m/min. Durante o experimento, a temperatura ambiente e a URA foram mantidas em aproximadamente 25° C e 50%, respectivamente.

A esteira possui uma grade de metal que gera um estímulo elétrico de 0,5 miliamperes e frequência regulada de modo que o intervalo entre os estímulos permita ao animal voltar para esteira. Além disso, a grade fica posicionada na parte posterior e em um nível inferior ao da esteira, o que permite ao animal identificar a proximidade com a grade de estímulo elétrico e evitar a exposição desnecessária.

A interrupção voluntária do esforço foi definida como o momento no qual o animal não foi mais capaz de manter a intensidade de exercício na esteira por 10 segundos (PIRES *et al.* 2007; WANNER *et al.* 2007).

#### 2.5.5 Procedimentos pós-experimentais de eutanásia

Após cada fase do experimento, os animais foram eutanasiados com uma dose letal da mistura de anestésico (Ketamina, 90 mg/kg de massa corporal, i.p. e Xilazina, 10,5 mg/kg de massa corporal, i.p.). Foram administradas 0,2 mL dessa mistura no cateter de silicone implantado na veia jugular.

### 2.5.6 Protocolo experimental 1 – Curva dose-resposta – Grupo 1 e Grupo 2

O protocolo experimental 1 foi composto por dois grupos de 6 animais. O grupo 1 consistiu dos animais que receberam a injeção de amônia em três concentrações diferentes ou salina (controle), sendo: 1 – Injeção Central de Salina; 2 – Injeção Central de 50 mM de amônia; 3 – Injeção Central de 450 mM de amônia; 4 – Injeção Central de 750 mM de amônia. Os volumes injetados de salina e de amônia nas diferentes concentrações foram de 2  $\mu$ L. O mesmo animal foi submetido às 4 situações experimentais, com um intervalo de no mínimo 48 horas entre cada situação.

Já o grupo 2 são os animais que receberam a injeção de lactato em três concentrações diferentes ou salina (controle), sendo: 1 – Injeção Central de Salina; 2 – Injeção Central de 2 mM de lactato; 3 – Injeção Central de 8 mM de lactato; 4 – Injeção Central de 15 mM de lactato. Os volumes injetados de salina e de lactato nas diferentes concentrações foram de 2  $\mu$ L. O mesmo animal foi submetido às 4 situações experimentais, com um intervalo de no mínimo 48 horas entre cada situação.

Esses grupos não foram submetidos ao exercício, pois o objetivo desse experimento foi investigar os efeitos das injeções sobre alterações metabólicas e enzimáticas ao longo do tempo e durante o repouso. Foi feita uma curva dose resposta com as diferentes concentrações de lactato ou amônia.

Os experimentos aconteceram entre às 10 e 12 horas. Após a saída do biotério, o animal foi pesado e transferido para a sala de experimento onde permaneceu 60 minutos em repouso. Após esse período, a agulha injetora foi colocada na cânula guia cerebral do animal. Essa agulha era conectada à um P10 de no máximo 30 cm e, na outra extremidade desse P10, era acoplado a seringa de Hamilton para realização da injeção intracerebroventricular. Uma cânula de P50 de no máximo 30 cm conectada a seringa de 1 mL também foi posicionado na cânula em “L” para realizar a colheita de sangue:

**Colheita 1:** 0,5 mL de sangue antes da injeção;

**Colheita 2:** 0,5 mL de sangue 5 minutos após a injeção;

**Colheita 3:** 0,5 mL de sangue 15 minutos após a injeção.

Todo o sangue retirado foi colocado em microtubos e centrifugado imediatamente por 10 min em uma temperatura de 4 °C e 3000 rotações por minuto para obtenção do plasma, que foi estocado e congelado rapidamente no freezer à -20 °C. Após cada fase do experimento, que consistiu nas 4 situações experimentais, o animal foi eutanasiado, como descrito anteriormente.

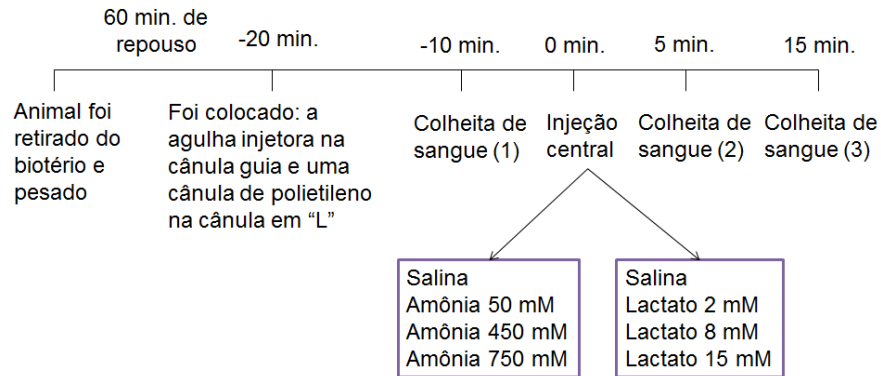
Para analisar os efeitos do lactato central sobre o metabolismo amônia foram mensuradas as concentrações plasmáticas de amônia, lactato e ureia. Como a via inicia-se com a utilização de glicose como substrato energético e posterior formação de piruvato que é convertido em lactato, reação catalisada pela enzima lactato desidrogenase, foram medidas também as concentrações plasmáticas dessa enzima e de glicose. Além disso, para avaliar se ocorre maior formação de aminoácidos foi medida a concentração de proteínas totais.

Dessa forma, foi preciso 0,5 mL de sangue para analisar as concentrações de amônia, de lactato, de ureia, de lactato desidrogenase, de glicose e de proteínas totais. Essas medidas foram feitas nas 3 colheitas de sangue e nos 12 animais dos dois grupos, porém o sangue de um animal do grupo 2 hemolisou, por isso as análises foram feitas somente em 5 animais desse grupo. Houve também um problema na mensuração da concentração plasmática de amônia. Esse metabólito é volátil e não poderia ter ficado estocado no freezer. Assim, não foi possível fazer uma análise confiável da concentração de amônia. Utilizamos então, a concentração plasmática de ureia como indicador de aumento da concentração de amônia no sangue.

**TABELA 1** - Protocolo experimental 1- Curva dose-resposta

| <b>Protocolo experimental 1</b>                     |                                  |                                   |                                   |
|---|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>GRUPO 1 - Sem Exercício e Injeção de Amônia</b>  |                                  |                                   |                                   |
| Controle (Salina)<br>Volume = 2 µL                  | 50 mM de amônia<br>Volume = 2 µL | 450 mM de amônia<br>Volume = 2 µL | 750 mM de amônia<br>Volume = 2 µL |
| <b>GRUPO 2 - Sem Exercício e Injeção de Lactato</b> |                                  |                                   |                                   |
| Controle (Salina)<br>Volume = 2 µL                  | 2 mM de lactato<br>Volume = 2 µL | 8 mM de lactato<br>Volume = 2 µL  | 15 mM de lactato<br>Volume = 2 µL |

### 2.5.6.1 Delineamento experimental 1 – Curva dose-reposta em repouso – Grupo 1 e Grupo 2



**FIGURA 9** - Representação do delineamento experimental 1 – Curva dose-resposta – Grupo 1 e Grupo 2.

FONTE: Produção do próprio autor.

### 2.5.7 Protocolo experimental 2 – Grupo 3

O protocolo do grupo 3 não estava previsto no cronograma. Os ratos foram submetidos ao exercício físico até a interrupção voluntária do esforço e foi dada a injeção ICV de amônia utilizando as concentrações pré-estabelecidas (450 mM) no protocolo experimental 1 baseado no aumento da concentração de ureia. Entretanto, os animais ( $n = 4$ ) não correram. Foi suposto que a concentração de amônia estivesse muito elevada, dessa forma não seria possível realizar o protocolo de exercício.

Para solucionar o problema, diminuimos a concentração de amônia e foi feito um novo experimento ( $n = 4$ ), somente com a injeção central de salina ou amônia nas seguintes concentrações: 400 mM, 350 mM ou 300 mM. Os ratos que receberam a injeção ICV de 400 mM e 350 mM também não correram. Somente os ratos que receberam injeção ICV de salina ou amônia em uma concentração igual a 300 mM correram mais de 15 minutos, dessa forma essa concentração foi escolhida para os experimentos subsequentes.

Foi necessário então desenvolver um novo protocolo experimental ( $n = 8$ ), já que os animais do grupo 1 receberam a injeção de amônia em três concentrações diferentes: 750 mM, 450

mM e 50 mM. Como se pode observar, não foi realizada injeção central de amônia na concentração de 300 mM nos animais em repouso.

Com relação a concentração de lactato, não houve nenhum problema quanto ao desempenho desses animais e a dose utilizada no protocolo 2 foi determinada então pelo resultado obtido no grupo 2 do experimento 1. A situação lactato 2 mM foi diferente da situação controle (salina), dessa forma essa concentração foi escolhida para os experimentos subsequentes.

Nesse novo protocolo experimental, os animais receberam a injeção de amônia, lactato, amônia mais lactato ou salina (controle), sendo: 1 – Injeção Central de Salina em um volume de 2  $\mu$ L; 2 – Injeção Central de 300 mM de amônia em um volume de 2  $\mu$ L; 3 – Injeção Central de 2 mM de lactato em um volume de 2  $\mu$ L; 4 – Injeção Central de 300 mM de amônia em um volume de 1  $\mu$ L mais 2 mM de lactato em um volume de 1  $\mu$ L. O mesmo animal foi submetido às 4 situações experimentais, com um intervalo de no mínimo 48 horas entre cada situação. Um animal desse grupo teve concentrações de glicose acima do esperado, por isso seu resultado não foi utilizado no presente estudo.

Os experimentos aconteceram entre às 10 e 12 horas. Após a saída do biotério, o animal foi pesado e transferido para a sala de experimento onde permaneceu 60 minutos em repouso. Após esse período, a agulha injetora foi colocada na cânula guia cerebral do animal. Essa agulha era conectada à um P10 de no máximo 30 cm e, na outra extremidade desse P10, era acoplado a seringa de Hamilton para realização da injeção intracerebroventricular. Uma cânula de P50 de no máximo 30 cm conectada a seringa de 1 mL também foi posicionado na cânula em “L” para realizar a colheita de sangue:

**Colheita 1:** 0,7 mL de sangue antes da injeção;

**Colheita 2:** 0,7 mL de sangue 5 minutos após a injeção;

**Colheita 3:** 0,2 mL de sangue 15 minutos após a injeção;

**Colheita 4:** 0,7 mL de sangue 20 minutos após a injeção.

Nas colheitas 1, 2 e 4 foram analisadas as concentrações plasmáticas de amônia, de lactato, de glicose e de glutamato e na colheita 3 foi medida somente a concentração de lactato e de glicose. O sangue coletado era transferido para 3 tubos distintos, pois cada kit utilizado para fazer as dosagens sugeria um tipo específico de anticoagulante ou não sugeria anticoagulante:

**Tubo 1** com 6 $\mu$ L de EDTA – Dosagem de Amônia - 0,25 mL de sangue;

**Tubo 2** com 3 $\mu$ L de Fluoreto – Dosagem de Lactao e Glicose – 0,2 mL de sangue;

**Tubo 3** sem anticoagulante – Dosagem de Glutamato – 0,25 mL de sangue.

Todo o sangue retirado foi colocado em microtubos e centrifugado imediatamente por 10 min em uma temperatura de 4 °C e 3000 rotações por minuto para obtenção do plasma, que foi estocado e congelado rapidamente no freezer à -20 °C. Após cada fase do experimento, que consistiu nas 4 situações experimentais, o animal foi eutanasiado, como descrito anteriormente.

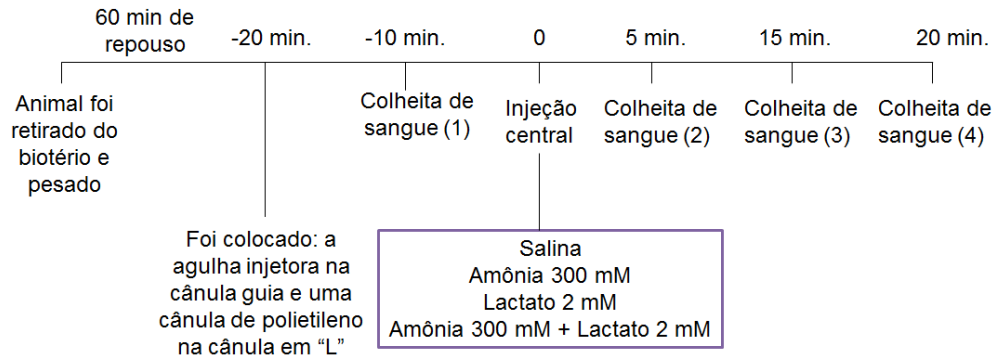
Como o volume de sangue retirado do animal durante o experimento foi elevado, era necessário utilizar um rato doador. Esse rato foi submetido somente à cirurgia de implante do cateter na jugular, como descrito anteriormente. O rato doador não foi submetido a nenhum protocolo experimental e permanecia no mesmo biotério que os demais animais. Antes de cada experimento, era retirado sangue desse rato doador e, após a colheita 1 e 2 do rato submetido ao experimento, era injetado na cânula jugular do rato submetido ao experimento 0,7 mL de sangue (do rato doador) para repor o volume retirado.

**TABELA 2** - Protocolo experimental 2 – grupo 3

| <b>Protocolo experimental 2</b>         |  |                                       |  |
|---|--|---------------------------------------|--|
| <b>GRUPO 3 - Sem Exercício</b>          |  |                                       |  |
| Controle (Salina)<br>Volume = 2 $\mu$ L | 300 mM de amônia<br>Volume = 2 $\mu$ L | 2 mM de lactato<br>Volume = 2 $\mu$ L | 300 mM de amônia<br>Volume = 1 $\mu$ L<br>+<br>2 mM de lactato<br>Volume = 1 $\mu$ L |



### 2.5.7.1 Delineamento Experimental 2 – Grupo 3



**FIGURA 10** - Representação do delineamento experimental 2 – Grupo 3. FONTE: Produção do próprio autor.

### 2.5.8 Experimento Exercício – Grupo 4

Os ratos do grupo 4 foram submetidos a um período de adaptação ao exercício na esteira motorizada. Durante os experimentos, os animais correram em uma esteira rolante para pequenos animais (Treadmill Simplex II, Columbus Instruments, EUA), em uma velocidade de 21 m/min e 5% de inclinação, até a interrupção voluntária do esforço, já previamente detalhado.

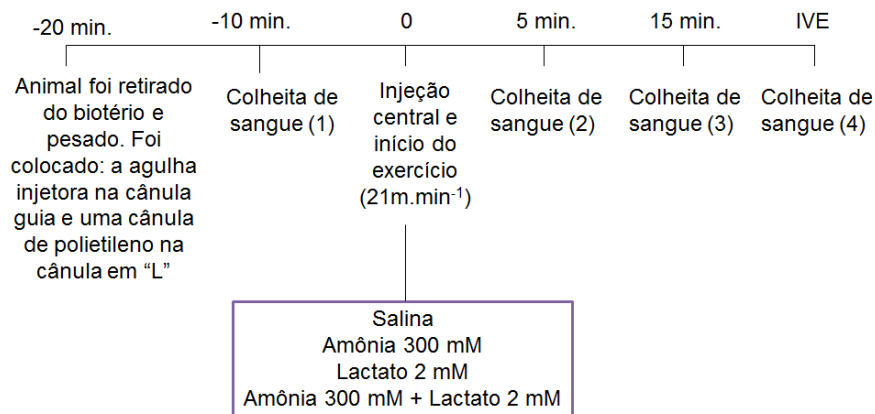
Os 12 animais passaram por todas as situações em que foi dada a injeção de salina ou lactato e/ou amônia, nas concentrações utilizadas no protocolo experimental 3. Um animal apresentou concentrações dos parâmetros bioquímicos que foram consideradas como *outlier* ( $\pm 2$  vezes o desvio padrão) e os seus resultados não foram utilizados. O grupo 4 consistiu em: 1 – Injeção Central de Salina em um volume de 2  $\mu\text{L}$  + exercício físico; 2 – Injeção Central de Amônia 300 mM em um volume de 2  $\mu\text{L}$  + exercício físico; 3 – Injeção Central de Lactato 2 mM em um volume de 2  $\mu\text{L}$  + exercício físico; 4 – Injeção Central de amônia 300 mM em um volume de 1  $\mu\text{L}$  e lactato 2 mM em um volume de 1  $\mu\text{L}$  + exercício físico. O mesmo animal foi submetido às 4 situações experimentais, com um intervalo de no mínimo 48 horas entre cada situação.

Foi seguido o mesmo protocolo usado no grupo 3, porém o animal foi transferido para a esteira rolante e o exercício físico foi iniciado após inserir a agulha injetora na cânula guia cerebral e a cânula P50 na cânula em “L”.

**TABELA 3** - Protocolo experimental 2 – grupo 4

| <b>Protocolo experimental 2</b>         |  |                                       |  |
|---|--|---------------------------------------|--|
| <b>GRUPO 4 - Com Exercício</b>          |  |                                       |  |
| Controle (Salina)<br>Volume = 2 $\mu$ L | 300 mM de amônia<br>Volume = 2 $\mu$ L | 2 mM de lactato<br>Volume = 2 $\mu$ L | 300 mM de amônia<br>Volume = 1 $\mu$ L<br>+<br>2 mM de lactato<br>Volume = 1 $\mu$ L |

#### 2.5.8.1 Delineamento Experimental 2 – Grupo 4



**FIGURA 11** - Representação esquemática do delineamento experimental 2 – Grupo 4. FONTE: Produção do próprio autor.

### 2.5.9 Variáveis

#### 2.5.9.1 Variáveis independentes

##### Exercício:

Exercício realizado até a interrupção voluntária do esforço

### 2.5.9.2 Variáveis dependentes

#### Concentração plasmática das variáveis metabólicas e enzimáticas:

Amônia pelo método enzimático usando o kit Amônia da marca Randox e referencia AM1015;

Lactato pelo método enzimático (Reação de Trinder) e kit Lactato Liquiform da marca Labtest e referencia 116;

Glicose pelo método colorimétrico (Reação de Trinder) e kit Glicose PAP liquiform da marca Labtest e referencia 84;

Lactato desidrogenase pelo método piruvato-lactato UV e kit LDH liquiform da marca Labtest;

Proteínas totais pelo método colorimétrico (Biureto) e kit Proteínas Totais da marca Labtest e referencia 99;

Ureia pelo método colorimétrico (Biureto) e kit Ureia CE da marca Labtest e referencia 27;

Glutamato pelo método colorimétrico e kit Glutamate Assay Kit da marca BioVision e catálogo K629-100 .

#### Tempo total de exercício:

O tempo total de exercício, em minutos, corresponde ao intervalo de tempo entre o início do exercício e o momento em que os ratos voluntariamente interromperam o exercício, que foi medido por um cronômetro com precisão de 0,01 segundos. O exercício foi interrompido no momento em que o rato não conseguiu manter a intensidade de exercício pré-estabelecida, preferindo o estímulo elétrico de 50 mV e 0,5 mA por pelo menos 10 segundos.

### 2.5.9.3 Variáveis de controle

#### Massa corporal dos animais:

Os animais foram pesados antes da realização dos experimentos por meio de uma balança eletrônica (Filizola®) com precisão de 0,5 g. A massa corporal dos animais foi utilizada como parâmetro para verificar a recuperação cirúrgica e o estado de hidratação.

### Temperatura no interior da esteira ( $T_{amb}$ , °C):

Durante a realização do exercício, a temperatura no interior da esteira foi controlada com a utilização de um ar condicionado e registrada a cada minuto através da utilização de um termossensor (YSI-409<sup>B</sup>, Yellow Spring Instruments, Dayton, EUA) fixado na parte superior da esteira e acoplado a um teletermômetro (YSI-400<sup>A</sup>, Yellow Spring Instruments, Dayton, EUA).

## **2.6 Análise Estatística**

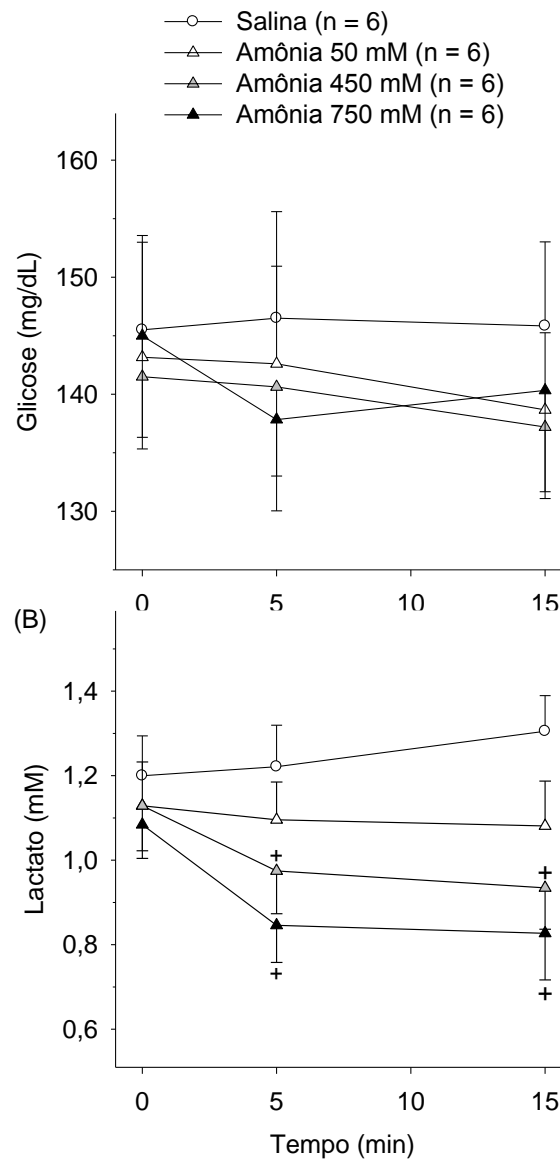
Para verificação da normalidade e homocedasticidade dos dados, foram utilizados os testes de *Shapiro – Wilk e Levene*, respectivamente. Os dados foram expressos com média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA). Foi usado ANOVA com um fator de variação para analisar o efeito da injeção central no tempo total de exercício e *post hoc* de *Tukey*.

Foi utilizado também ANOVA com dois fatores de variação com medidas repetidas para analisar o efeito da injeção central na concentração plasmática das variáveis metabólicas e enzimáticas (amônia, lactato, ureia, proteínas totais, glicose, lactato desidrogenase e glutamato) ao longo do tempo. Quando apropriado, foi utilizado um teste *post hoc* de *Fisher LSD*. O nível de significância adotado foi de  $P \leq 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Resultados do experimento 1 – Curva dose-resposta - Grupo 1

##### 3.1.1 Efeitos da injeção ICV de salina ou de amônia sobre a concentração plasmática de glicose e de lactato durante o repouso.

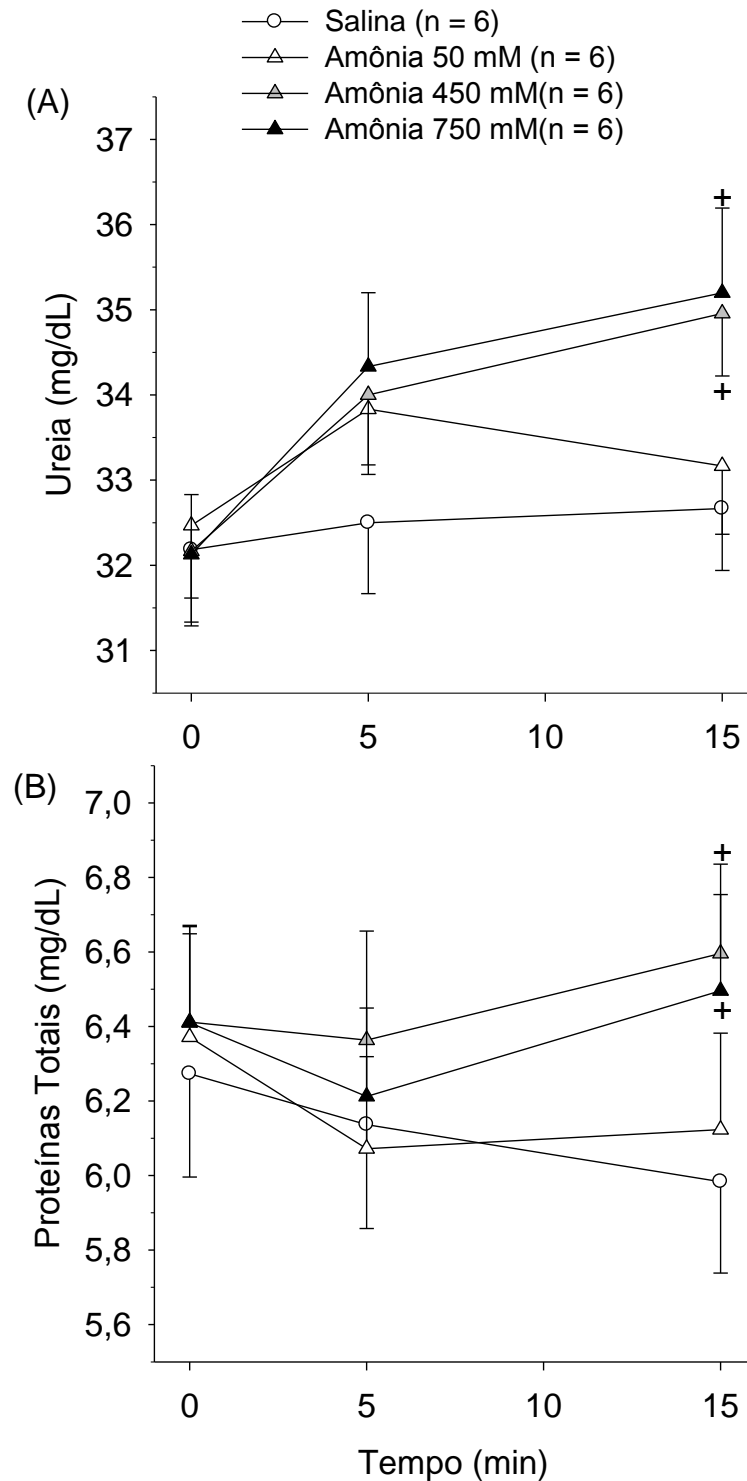


**GRÁFICO 1** - Concentração plasmática de glicose em mg/dL (A) e concentração plasmática de lactato em mM (B) antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central durante o repouso. +  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle.

Houve uma diminuição na concentração de lactato quando foi injetada amônia na concentração de 450 mM (AM 450) após 5 minutos ( $0,9 \pm 0,1$  mM,  $P = 0,01$ ) e 15 minutos ( $0,9 \pm 0,09$  mM,  $P = 0,009$ ) e também quando foi injetado amônia à 750 mM (AM 750) após 5 minutos ( $0,8 \pm 0,08$  mM,  $P = 0,03$ ) e 15 minutos ( $0,8 \pm 0,1$  mM,  $P = 0,02$ ) com relação a situação controle (SAL) (15 min  $1,2 \pm 0,09$  mM; 20 min  $1,3 \pm 0,08$  mM). Não houve diferença na situação que recebeu amônia à 50 mM (AM 50) (15 min  $1,0 \pm 0,08$  mM; 20 min  $1,08 \pm 0,1$  mM).

Não foram encontradas diferenças na concentração de glicose ao longo do tempo, após a injeção intracerebroventricular de salina (5 min  $146,5 \pm 9,1$  mg/dL; 15 min  $142,6 \pm 8,3$  mg/dL), de amônia à 50 mM (5 min  $140,6 \pm 7,6$  mg/dL; 15 min  $137,8 \pm 7,7$  mg/dL), de amônia à 450 mM (5 min  $145,8 \pm 7,1$  mg/dL; 15 min  $138,6 \pm 6,5$  mg/dL) ou de amônia à 750 mM (5 min  $137,2 \pm 5,5$  mg/dL; 15 min  $140,3 \pm 9,2$  mg/dL).

3.1.2 Efeitos da injeção ICV de salina ou de amônia sobre a concentração plasmática de ureia, de proteínas totais e de LDH durante o repouso.



**GRÁFICO 2** - Concentração plasmática de ureia em mg/dL (A) e concentração plasmática de proteínas totais em mg/dL (B) antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central durante o repouso. +  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle.

**TABELA 4** - Concentração de LDH em U/L antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central na situação que recebeu salina (controle) ou amônia.

| Concentração de LDH (U/L) | Minuto 0     | Minuto 5     | Minuto 15    | <i>P</i> |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| Controle                  | 204,2 ± 26,6 | 217,6 ± 30,2 | 225,3 ± 29,6 | 0,89     |
| Amônia 50 mM              | 216,2 ± 29,0 | 229,7 ± 26,6 | 240,5 ± 32,1 | 0,76     |
| Amônia 450 mM             | 223,7 ± 27,9 | 230,7 ± 24,8 | 231,9 ± 24,3 | 0,61     |
| Amônia 750 mM             | 230,9 ± 26,8 | 257,3 ± 32,1 | 262,8 ± 30,1 | 0,86     |

De acordo com o GRAF. 2 (A), após 15 minutos da injeção central de amônia à 450 mM ( $34,9 \pm 0,7$  mg/dL,  $P = 0,004$ ) e à 750 mM ( $35,1 \pm 0,9$  mg/dL,  $P = 0,003$ ) houve uma maior concentração de ureia quando comparado a situação controle ( $32,1 \pm 0,8$  mg/dL). Não houve diferença significativa no minuto 5 nas concentrações de ureia nas quatro situações estudadas (SAL  $32,5 \pm 0,8$  mg/dL; AM 50 mM  $33,8 \pm 0,7$  mg/dL; AM 450 mM  $34,0 \pm 0,8$  mg/dL; AM 750 mM  $34,3 \pm 0,8$  mg/dL).

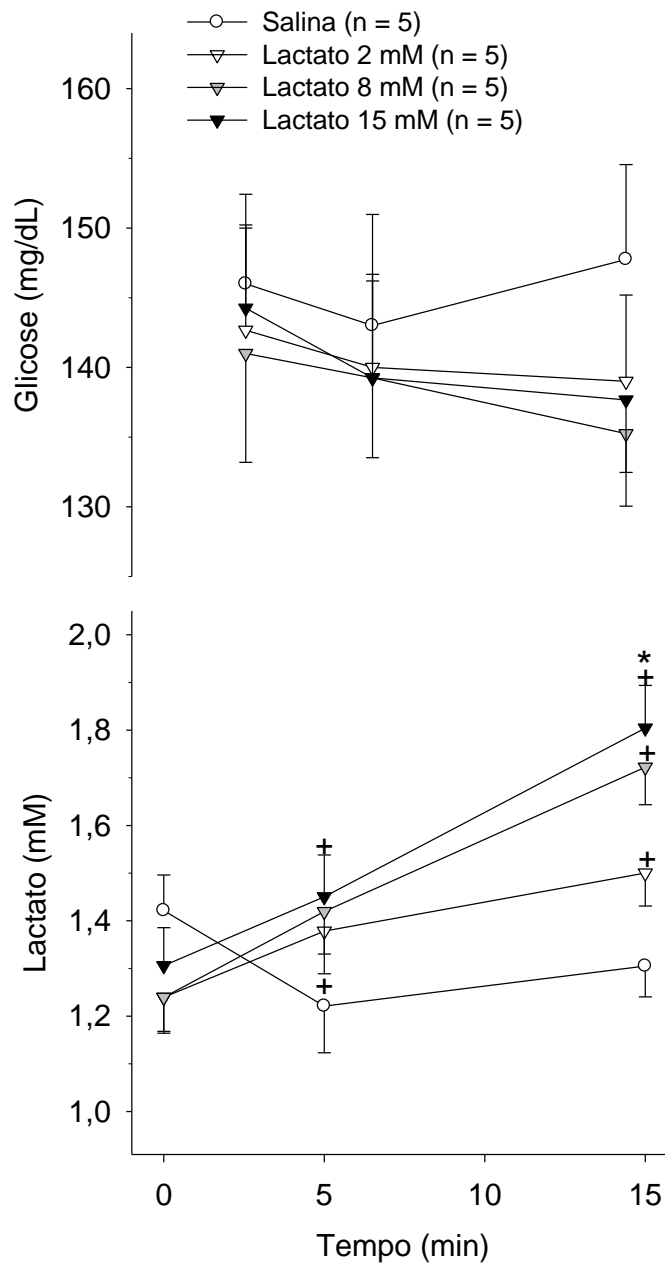
Também foram encontradas maiores concentrações de proteínas totais na situação que recebeu injeção central de amônia à 450 mM ( $6,5 \pm 0,2$  mg/dL,  $P = 0,05$ ) e à 750 mM ( $6,4 \pm 0,2$  mg/dL,  $P = 0,05$ ) no minuto 15 quando comparados a situação controle ( $5,9 \pm 0,2$  mg/dL). Não houve diferença significativa no minuto 5 na concentração de proteína total nas quatro situações estudadas (SAL  $6,1 \pm 0,2$  mg/dL; AM 50 mM  $6,0 \pm 0,2$  mg/dL; AM 450 mM  $6,3 \pm 0,2$  mg/dL; AM 750 mM  $6,2 \pm 0,2$  mg/dL).

De acordo com a TAB. 4, não houve diferenças significativas na concentração de LDH ao longo do tempo nas situações que receberam amônia quando comparadas com a situação que recebeu salina.



### 3.2 Resultados do experimento 1 – Curva dose-resposta - Grupo 2

#### 3.2.1 Efeitos da injeção ICV de salina ou de lactato sobre a concentração plasmática de glicose e de lactato durante o repouso.

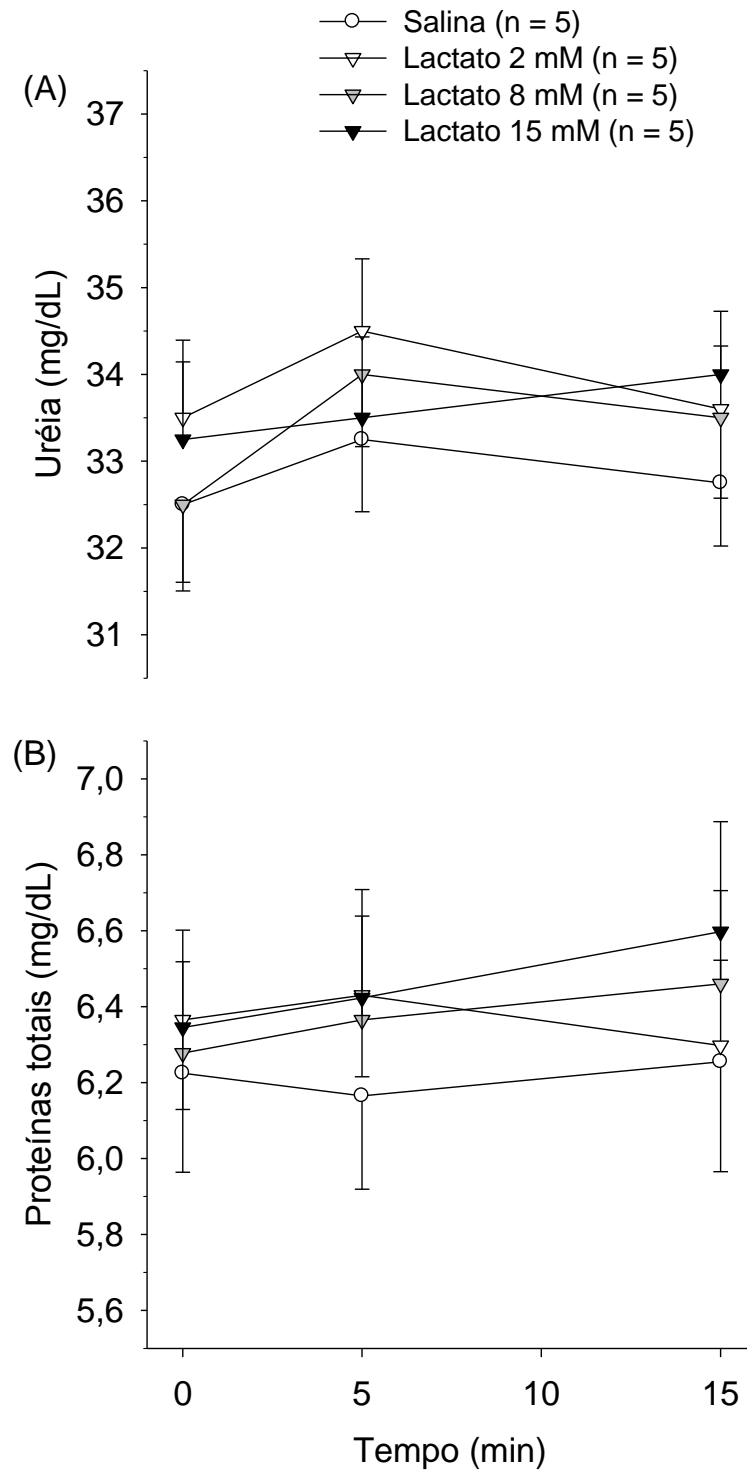


**GRÁFICO 3** - Concentração plasmática de glicose em mg/dL (A) e concentração plasmática de lactato em mM (B) antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central durante o repouso. +  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle.; \*  $P \leq 0,05$  em relação a situação lactato 2 mM.

Houve um aumento na concentração de lactato após 5 minutos da injeção de lactato à 8 mM ( $1,4 \pm 0,08$  mM,  $P = 0,05$ ) e à 15 mM ( $1,4 \pm 0,08$  mM,  $P = 0,03$ ) em comparação a situação controle ( $1,2 \pm 0,09$  mM). Também foi encontrada diferença após 15 minutos na situação lactato à 2 mM ( $1,5 \pm 0,06$  mM,  $P = 0,03$ ), à 8 mM ( $1,7 \pm 0,07$  mM,  $P = 0,03$ ) e à 15 mM ( $1,8 \pm 0,08$ ,  $P = 0,02$ ) em comparação a situação controle ( $1,3 \pm 0,06$  mM). No minuto 15, a concentração de lactato na situação que recebeu lactato à 15 mM foi maior que a concentração na situação que recebeu lactato à 2 mM ( $P = 0,03$ )

Não foi encontrada diferença na concentração de glicose ao longo do tempo após a injeção intracerebroventricular na situação controle (5 min  $143,3 \pm 7,9$  mg/dL; 15 min  $147,7 \pm 6,8$  mg/dL) e nas situações tratadas com lactato: 2 mM (5 min  $149,8 \pm 6,3$  mg/dL; 15 min  $139,2 \pm 6,1$  mg/dL), 8 mM (5 min  $139,2 \pm 5,7$  mg/dL; 15 min  $135,3 \pm 5,2$  mg/dL) e 15 mM (5 min  $135,2 \pm 6,9$  mg/dL; 15 min  $137,6 \pm 5,2$  mg/dL).

3.2.2 Efeitos da injeção ICV de salina ou de lactato sobre a concentração plasmática de ureia, de proteínas totais e de LDH durante o repouso.



**GRÁFICO 4** - Concentração plasmática de ureia em mg/dL (A) e concentração plasmática de proteínas totais em mg/dL (B) antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central durante o repouso. +  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle.

**TABELA 5** - Concentração de LDH em U/L antes (min 0), após 5 e 15 minutos da injeção central na situação que recebeu salina (controle) ou lactato.

| Concentração de LDH (U/L) | Minuto 0     | Minuto 5     | Minuto 15    | <i>P</i> |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| Controle                  | 245,2 ± 30,7 | 215,2 ± 28,3 | 225,3 ± 29,6 | 0,91     |
| Lactato 2 mM              | 206,2 ± 39,4 | 230,1 ± 25,6 | 249,2 ± 28,7 | 0,63     |
| Lactato 8 mM              | 224,5 ± 29,2 | 240,2 ± 26,5 | 231,9 ± 24,3 | 0,82     |
| Lactato 15 mM             | 235,9 ± 34,7 | 290,6 ± 27,0 | 289,2 ± 37,3 | 0,51     |

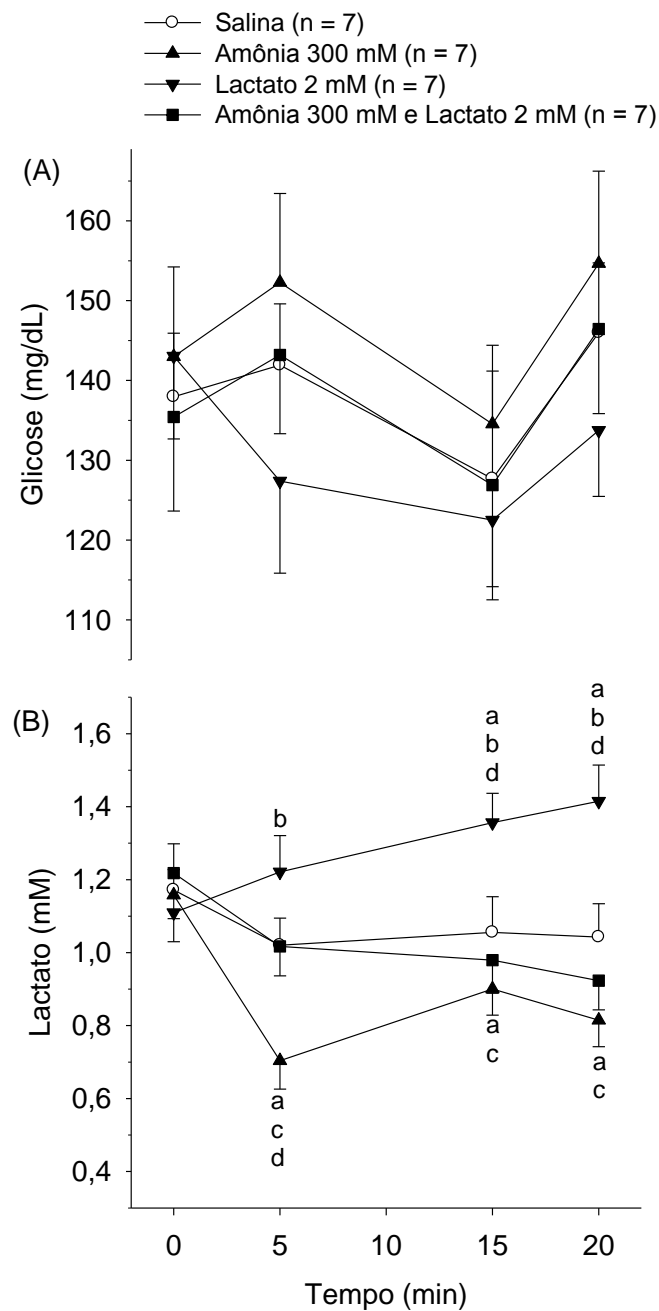
Não houve diferença significativa na concentração de ureia na situação controle (5 min 33,2 ± 0,8 mg/dL; 15 min 32,3 ± 0,7 mg/dL) e nas situações lactato: 2 mM (5min 34,2 ± 0,8 mg/dL; 15 min 33,6 ± 0,6 mg/dL), 8mM (5 min 34,0 ± 0,9; 15 min 33,2 ± 0,9 mg/dL) e 15mM (5 min 35,0 ± 0,9 mg/dL; 15 min 34,9 ± 0,7 mg/dL).

Também não houve diferença na concentração de proteínas totais nas situação controle (5 min 6,1 ± 0,2 mg/dL; 15 min 6,2 ± 0,2 mg/dL) e nas situações tratadas com lactato: 2 mM (5 min 6,4 ± 0,2 mg/dL; 15min 6,2 ± 0,2 mg/dL), 8mM ( 5 min 6,3 ± 0,2 mg/dL; 15 min 6,4 ± 0,2 mg/dL) e 15mM (5 min 6,4 ± 0,2 mg/dL; 15 min 6,5 ± 0,2 mg/dL).

De acordo com a TAB. 5, não houve diferenças significativas na concentração de LDH ao longo do tempo nas situações que receberam lactato quando comparadas com a situação que recebeu salina.

### 3.3 Resultados do experimento 2 – Grupo 3

#### 3.3.1 Efeitos da injeção ICV sobre a concentração plasmática de glicose e de lactato durante o repouso.



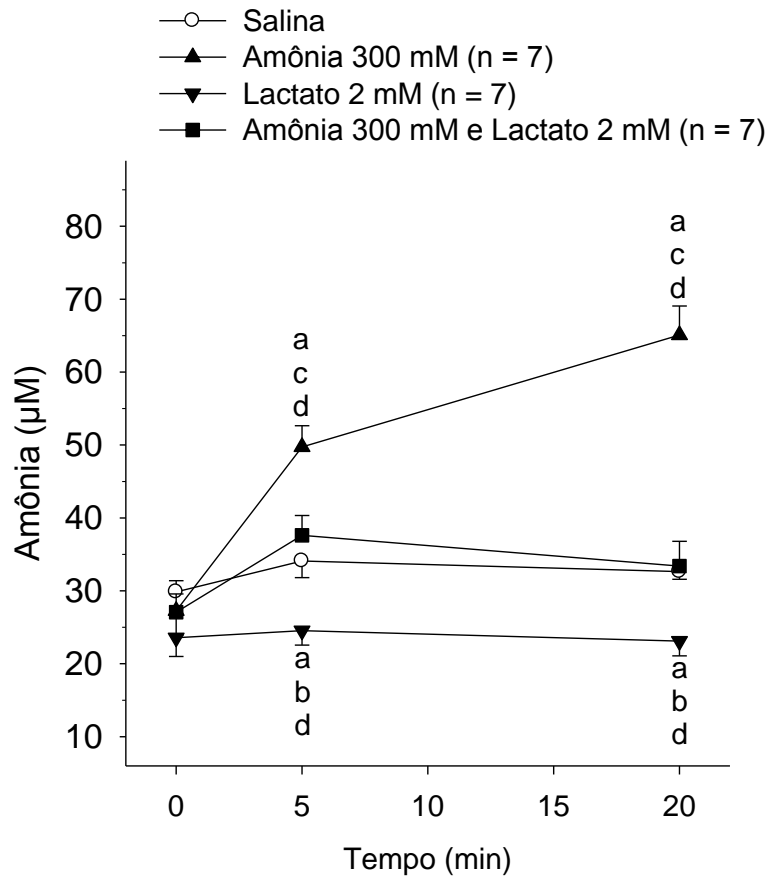
**GRÁFICO 5** - Concentração plasmática de glicose em mg/dL (A) e concentração plasmática de lactato em mM (B) antes (min 0), após 5, 15 e 20 minutos da injeção central durante o repouso. *a*  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle; *b*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM; *c*  $P \leq 0,05$  em relação a situação lactato 2 mM e *d*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM mais lactato 2 mM.

De acordo com o GRAF. 5 (B), a injeção intracerebroventricular de amônia causou uma diminuição na concentração de lactato ( $0,7 \pm 0,07$  mM) no minuto 5 em comparação a situação controle ( $1,0 \pm 0,07$  mM,  $P = 0,03$ ), a situação lactato ( $1,2 \pm 0,09$  mM,  $P < 0,001$ ) e a situação amônia mais lactato ( $1,0 \pm 0,08$  mM,  $P < 0,001$ ). Nos minutos 15 e 20 também houve uma diminuição na concentração de lactato na situação amônia (15 min  $0,9 \pm 0,07$  mM; 20 min  $0,8 \pm 0,07$  mM) em comparação a situação controle (15min  $1,0 \pm 0,09$  mM,  $P = 0,05$ ; 20 min  $1,0 \pm 0,09$  mM,  $P = 0,05$ ) e a situação lactato (15 min  $1,3 \pm 0,08$  mM,  $P < 0,001$ ; 20 min  $1,4 \pm 0,09$ mM  $P < 0,001$ ).

No grupo que recebeu a injeção de lactato houve uma maior concentração do mesmo no minuto 15 ( $1,3 \pm 0,08$  mM) e no minuto 20 ( $1,4 \pm 0,09$  mM) em comparação a situação controle (15 min  $1,0 \pm 0,09$  mM,  $P = 0,005$ ; 20 min  $1,0 \pm 0,09$  mM,  $P < 0,001$ ) e a situação amônia mais lactato (15 min  $0,9 \pm 0,09$  mM,  $P = 0,004$ ; 15 min  $0,9 \pm 0,08$ ,  $P < 0,001$ ).

Não foi encontrada diferença na concentração de glicose ao longo do tempo após os tratamentos no minuto 5 (SAL  $141,9 \pm 7,6$  mg/dL; AM  $152,2 \pm 11,1$  mg/dL; LAC  $127,3 \pm 11,5$  mg/dL; AM mais LAC  $14,1 \pm 9,8$  mg/dL), no minuto 15 (SAL  $127,6 \pm 13,4$  mg/dL, AM  $134,5 \pm 9,8$  mg/dL; LAC  $122,5 \pm 8,3$  mg/dL; AM mais LAC  $126,8 \pm 14,3$  mg/dL) e no minuto 20 (SAL  $145,9 \pm 8,7$  mg/dL; AM  $154,6 \pm 11,5$  mg/dL; LAC  $133,7 \pm 8,2$  mg/dL; AM mais LAC  $146,4 \pm 10,6$  mg/dL).

### 3.3.2 Efeitos da injeção ICV sobre a concentração plasmática de amônia durante o repouso.

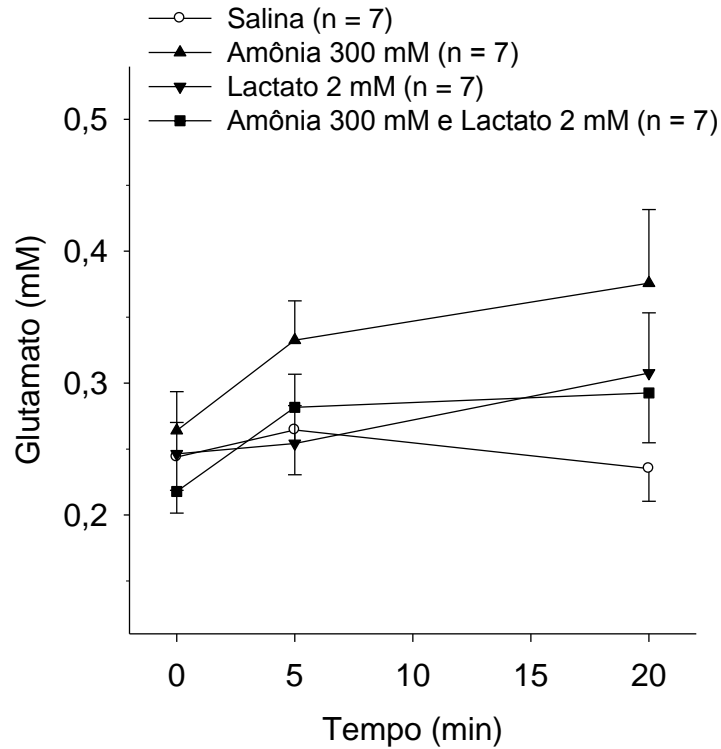


**GRÁFICO 6** - Concentração plasmática de amônia em  $\mu\text{M}$  antes (min 0), após 5 e 20 minutos da injeção central durante o repouso. *a*  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle; *b*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM; *c*  $P \leq 0,05$  em relação a situação lactato 2 mM e *d*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM mais lactato 2 mM.

Após a injeção central de amônia houve um aumento na concentração da mesma no minuto 5 ( $49,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$ ) e no minuto 20 ( $65,0 \pm 3,9 \mu\text{M}$ ) em comparação a situação controle (5 min  $34,0 \pm 2,2 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,001$ ; 20 min  $32,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,001$ ), a situação lactato (5min  $24,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,001$ ; 20 min  $23,1 \pm 2,0 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,001$ ) e a situação amônia mais lactato (5 min  $37,6 \pm 2,7 \mu\text{M}$ ,  $P = 0,004$ ; 20min  $33,4 \pm 3,3 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,001$ ).

No grupo que recebeu lactato ocorreu uma diminuição da concentração de amônia plasmática no minuto 5 ( $24,5 \pm 1,9 \mu\text{M}$ ) e no minuto 20 ( $23,1 \pm 2,0 \mu\text{M}$ ) em comparação a situação controle ( $P = 0,02$ ) e a situação amônia mais lactato ( $P = 0,01$ ).

### 3.3.3 Efeitos da injeção ICV sobre a concentração sorológica de glutamato durante o repouso.



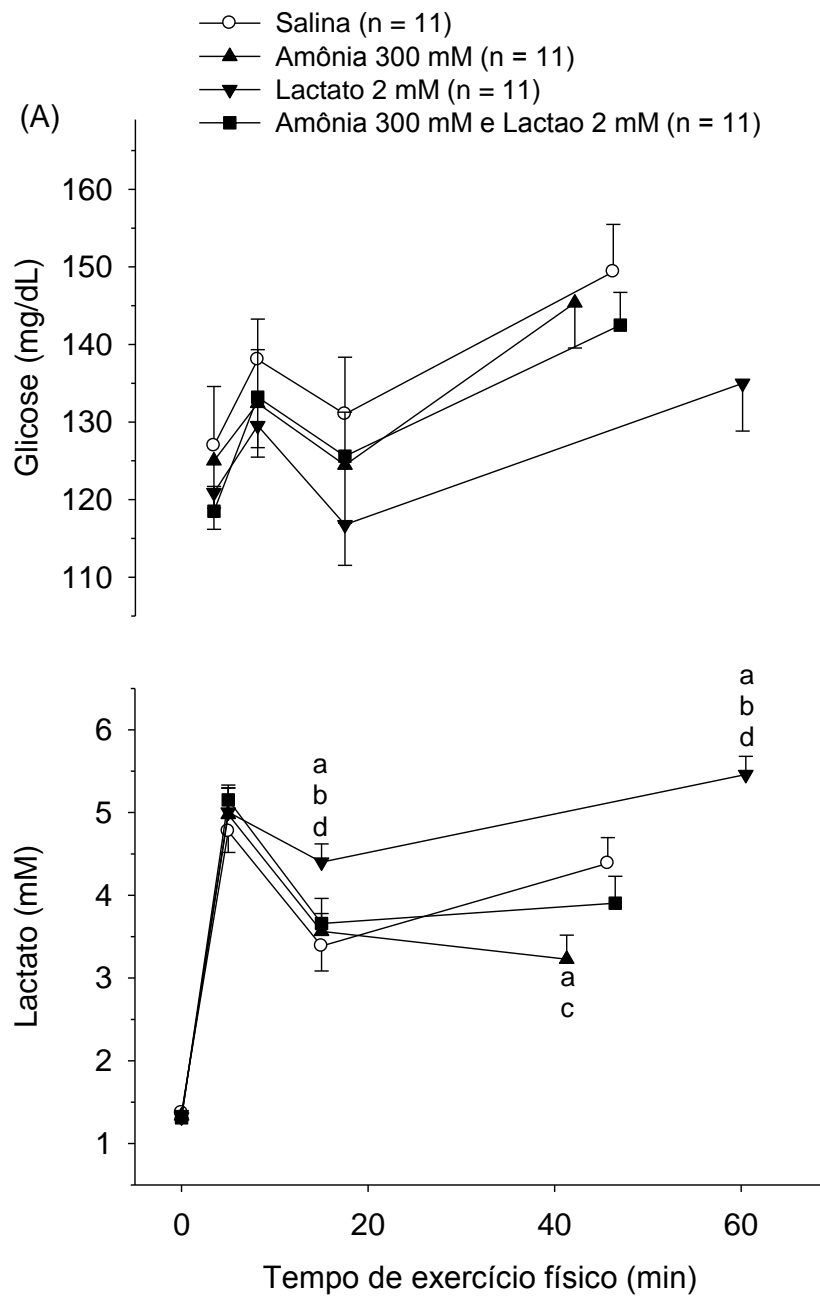
**GRÁFICO 7** - Concentração de glutamato em mM antes (min 0), após 5 e 20 minutos da injeção central durante o repouso.

Durante o repouso, não foram encontradas diferenças significativas na concentração de glutamato no minuto 5 (SAL  $0,2 \pm 0,03$  mM; AM  $0,3 \pm 0,02$  mM; LAC  $0,2 \pm 0,02$  mM; AM mais LAC  $0,2 \pm 0,02$  mM) e no minuto 20 (SAL  $0,2 \pm 0,02$  mM; AM  $0,3 \pm 0,05$  mM; LAC  $0,3 \pm 0,04$  mM; AM mais LAC  $0,2 \pm 0,03$  mM).



### 3.4 Resultados do experimento 2 – Grupo 4

#### 3.4.1 Efeitos da injeção ICV sobre a concentração plasmática de glicose e de lactato durante o exercício físico.



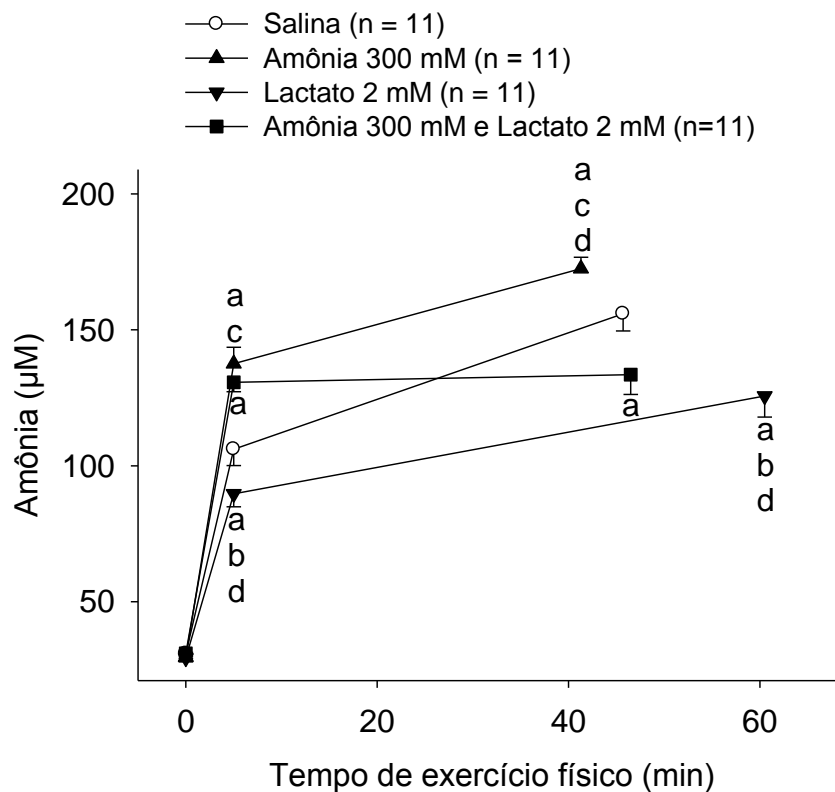
**GRÁFICO 8** - Concentração plasmática de glicose em mg/dL (A) e concentração plasmática de lactato em mM (B) durante o exercício físico, antes (min 0) da injeção central, após 5, 15 e na interrupção voluntária do esforço (IVE). *a*  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle; *b*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM; *c*  $P \leq 0,05$  em relação a situação lactato 2 mM e *d*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM mais lactato 2 mM.

Como esse grupo foi submetido ao exercício físico, a concentração de lactato foi maior durante a corrida comparado ao repouso, incluindo nos animais tratados com salina. A injeção intracerebroventricular de lactato causou um aumento na concentração do mesmo no minuto 15 ( $4,4 \pm 0,2$  mM) e na interrupção do esforço ( $5,4 \pm 0,2$  mM) em comparação a situação controle (15 min  $3,3 \pm 0,3$  mM,  $P = 0,01$ ; IVE  $4,3 \pm 0,3$  mM,  $P = 0,007$ ), a situação amônia (15 min  $3,5 \pm 0,2$  mM,  $P = 0,002$ ; IVE  $3,2 \pm 0,2$  mM,  $P < 0,001$ ) e a situação amônia mais lactato (15 min  $3,6 \pm 0,3$  mM,  $P = 0,04$ ; IVE  $3,9 \pm 0,3$  mM,  $P < 0,001$ ).

No momento da interrupção voluntária do esforço, foi verificada menor concentração de lactato na situação que recebeu amônia intracerebroventricularmente em comparação a situação controle ( $P = 0,01$ ).

Não houve diferença significativa na concentração de glicose entre as situação controle (5 min  $138,0 \pm 5,2$  mg/dL; 15 min  $131,0 \pm 7,3$  mg/dL; IVE  $149,3 \pm 6,1$  mg/dL), amônia (5 min  $132,4 \pm 5,7$  mg/dL; 15 min  $124,4 \pm 7,4$  mg/dL; IVE  $145,3 \pm 5,8$  mg/dL), lactato (5 min  $129,5 \pm 4,0$  mg/dL; 15 min  $116,7 \pm 5,2$  mg/dL; IVE  $134,9 \pm 6,1$  mg/dL) e amônia mais lactato (5 min  $133,2 \pm 6,1$  mg/dL; 15 min  $125,5 \pm 5,6$  mg/dL; IVE  $142,4 \pm 4,2$  mg/dL).

### 3.4.2 Efeitos da injeção ICV sobre a concentração plasmática de amônia durante o exercício físico.

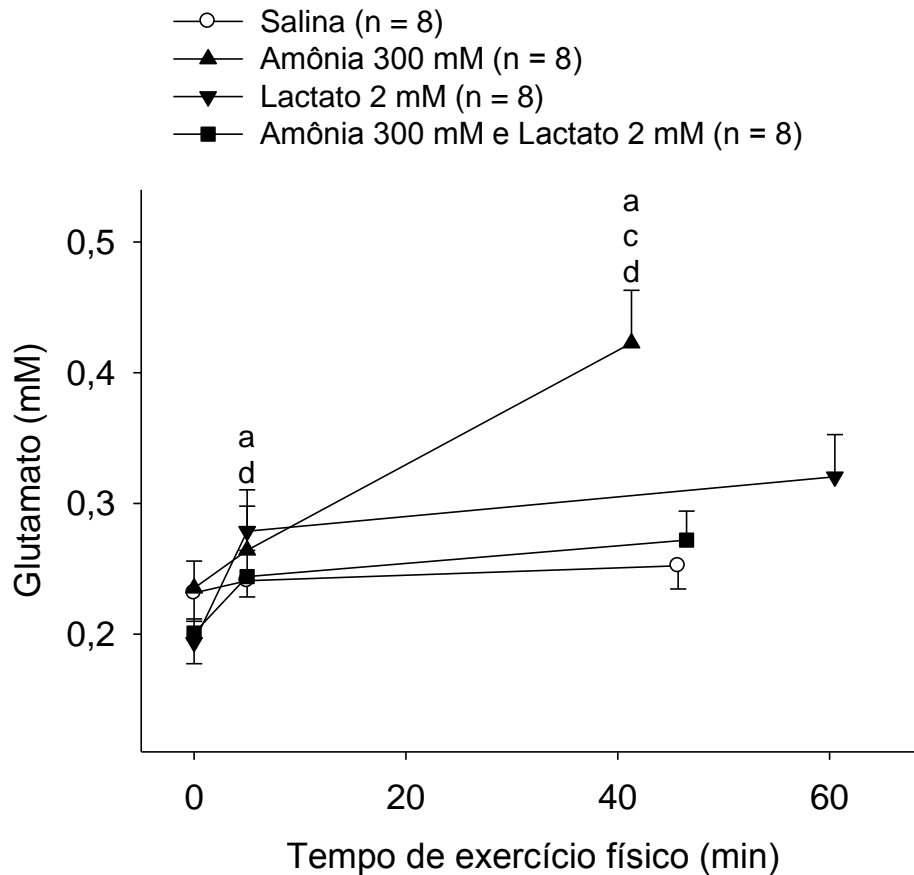


**GRÁFICO 9** - Concentração de amônia em  $\mu\text{M}$  durante o exercício físico, antes (min 0) da injeção central, após 5 minutos e na interrupção voluntária do esforço (IVE). *a*  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle; *b*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM; *c*  $P \leq 0,05$  em relação a situação lactato 2 mM e *d*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM mais lactato 2 mM.

De acordo com o GRAF. 9, houve uma maior concentração de amônia na situação que recebeu injeção do metabólito no minuto 5 ( $137,5 \pm 6,0 \mu\text{M}$ ) em comparação a situação controle ( $106,0 \pm 6,0 \mu\text{M}$ ,  $p = 0,02$ ) e a situação lactato ( $89,6 \pm 4,7 \mu\text{M}$ ). No momento da interrupção voluntária do esforço também houve maior concentração de amônia na situação amônia ( $172,5 \pm 4,1 \mu\text{M}$ ) em comparação as demais situações (SAL  $155,9 \pm 6,3 \mu\text{M}$ ,  $P = 0,02$ ; LAC  $125,6 \pm 7,7 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,001$ ; AM + LAC  $133,5 \pm 7,2 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,001$ ).

A situação que recebeu injeção de lactato apresentou uma menor concentração de amônia no minuto 5 e na interrupção voluntária do esforço em comparação a situação controle (min 5  $P = 0,02$ ; IVE  $P < 0,001$ ) e a situação amônia mais lactato (5 min  $130,6 \pm 3,4 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,001$ ; IVE  $133,5 \pm 7,2 \mu\text{M}$ ,  $P = 0,004$ ). Na situação amônia mais lactato, a concentração de amônia foi maior no minuto 5 ( $P < 0,001$ ) e menor na interrupção do esforço ( $P < 0,001$ ) em relação a situação controle.

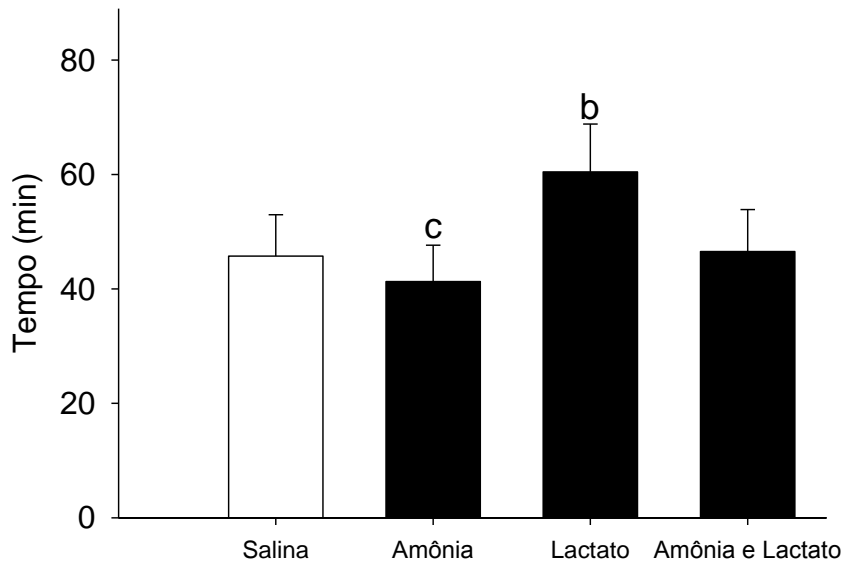
### 3.4.3 Efeitos da injeção ICV sobre a concentração sorológica de glutamato durante o exercício físico.



**GRÁFICO 10** - Concentração de glutamato em mM durante o exercício físico, antes (min 0) da injeção central, após 5 minutos e na interrupção voluntária do esforço (IVE). *a*  $P \leq 0,05$  em relação a situação controle; *c*  $P \leq 0,05$  em relação a situação lactato 2 mM e *d*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM mais lactato 2 mM.

Pode-se observar um aumento na concentração de glutamato no grupo que recebeu injeção central de amônia no minuto 5 ( $0,23 \pm 0,03$  mM) em comparação a situação controle ( $0,24 \pm 0,01$  mM,  $P = 0,01$ ) e a situação amônia mais lactato ( $0,24 \pm 0,02$  mM,  $P = 0,02$ ) e também na interrupção do esforço nesse mesmo grupo ( $0,42 \pm 0,04$  mM) quando comparado a situação controle ( $0,25 \pm 0,01$  mM,  $P < 0,001$ ), a situação lactato ( $0,32 \pm 0,032$  mM,  $P = 0,03$ ) e a situação amônia mais lactato ( $0,27 \pm 0,02$  mM,  $P = 0,001$ ).

### 3.4.4 Efeitos da injeção ICV no tempo total de exercício.



**GRÁFICO 11** - Tempo total de exercício. *b*  $P \leq 0,05$  em relação a situação amônia 300 mM; *c*  $P \leq 0,05$  em relação a situação lactato 2 mM.

O GRAF. 11 apresenta os valores médios do tempo total de exercício após as injeções centrais. A injeção de amônia antecipou na interrupção do esforço em 30,7% ( $n = 11$ ;  $P < 0,01$ ) quando comparado com os ratos que receberam lactato intracerebroventricular. Os ratos tratados com amônia correram  $41,3 \pm 6,4$  min, enquanto os ratos tratados com lactato correram  $60,4 \pm 8,4$  min. Já os ratos da situação controle correram  $45,7 \pm 7,1$  min, enquanto os ratos que receberam a injeção de lactato mais amônia correram  $46,5 \pm 7,3$  min.

## 4 DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi que o lactato neutraliza o aumento da concentração de amônia durante o exercício físico. Ao injetar lactato houve uma menor concentração de amônia e ao adicionar amônia houve uma menor concentração de lactato. Outro achado importante foi que houve alteração no tempo total de exercício, o que indica que amônia e lactato influenciam no desempenho.

### 4.1 Alteração na concentração plasmática de amônia

A concentração basal de amônia do presente estudo (30  $\mu\text{M}$ ) está de acordo com os estudos de Nybo *et al.* (2005), Morh *et al.* (2006) e Carvalho-Peixoto *et al.* (2007), porém é diferente da concentração encontrada por Almeida *et al.* (2010), que foi de 60  $\mu\text{M}$ . Essa diferença pode ser explicada pelo método utilizado para dosar a concentração de amônia, pois a mesma é volátil, dependendo do tempo que a amostra fica armazenada antes da análise, é possível que parte da amônia presente na amostra evapore, reduzindo as concentrações medidas.

A amônia chega ao fígado pela veia porta hepática, onde é incorporada na uréia ou se une ao  $\alpha$ -cetoglutarato por meio da glutamina sintetase (GS), uma reação que ocorre dentro dos hepatócitos presentes em torno da veia hepática (HAUSSINGER, 1983; HAUSSINGER *et al.* 1992; OLDE DAMINK *et al.* 2009). Isso está de acordo com o GRAF. 2A, o qual mostra uma maior formação de uréia no grupo que recebeu amônia a 450 e 750 mM em comparação com o grupo controle. Uma vez formada, a uréia é excretado do corpo pela urina.

Este sistema de desintoxicação é altamente eficiente, sendo o fígado saudável é capaz de remover toda a amônia da circulação porta em um uma única passagem do sangue, mesmo com alteração do estado nutricional (YANG *et al.* 2000). O sistema de desintoxicação assegura que as concentrações plasmáticas de amônia sejam mantidas entre 20 e 80  $\mu\text{M}$  (VAN HALL *et al.* 1995; BANGSBO *et al.* 1996; FELIPO; BUTTERWORTH, 2002). Esses valores estão de acordo com os nossos resultados, tanto no experimento de repouso quanto no experimento de exercício, as concentrações basais foram em torno de 30  $\mu\text{M}$ .

Durante o repouso, ao injetar 300 mM de amônia intracerebroventricular, observamos um aumento na concentração da mesma no plasma. Esses achados estão de acordo com outros estudos (SUAREZ *et al.* 2002; BAK *et al.* 2006; CAULI *et al.* 2006) que provam que a amônia ultrapassa a barreira hematoencefálica.

Como os ratos utilizados possuem em torno de 15 mL de sangue, ao injetar 2  $\mu$ L de amônia em uma concentração de 300 mM no SNC, a droga ultrapassa a barreira hematoencefálica e é diluída no sangue. O aumento na concentração de amônia nos minutos 5 e 15 foi em torno de 40  $\mu$ M, que está coerente com os cálculos previstos e o resultado encontrado. Essa alteração não foi observada no grupo controle, mostrando que o aumento na concentração plasmática de amônia foi devido à injeção central da mesma.

A proporção de amônia em solução gasosa ( $\text{NH}_3$ ) ou iônica ( $\text{NH}_4^+$ ) é dependente do pH. Há relatos que o pKa pode ser entre 9,01 e 9,25 em repouso (BROMBERG *et al.* 1960; KATZ *et al.* 1986; MARCAGGI; COLES, 2001) e que durante o exercício, o pKa diminui para 7,1 e 6,6 (SAHLIN *et al.* 1976). Assim, 99% de toda a amônia dentro do corpo humano em repouso ou durante o exercício está na forma de íons (WILKINSON *et al.* 2010). Dessa forma, ao manipular a droga para ser injetada foi necessário corrigir o pH para que qualquer resultado obtido fosse por causa do aumento da concentração de amônia e não pela alteração do pH no SNC.

Outros órgãos além do fígado, como o cérebro e o músculo esquelético também contribuem para a regular o metabolismo da amônia (OLDE DAMINK *et al.* 2002; OLDE DAMINK *et al.* 2009). Olde Damink *et al.* (2002) estimaram que em seres humanos saudáveis, a absorção de amônia no músculo esquelético em repouso está perto de zero, indicando que somente o músculo em contração pode contribuir significativamente para o metabolismo de amônia.

Deste modo, durante o exercício, ocorre aumento da produção de amônia pelo ciclo CPN, já explicado anteriormente. Estudos sugerem que a produção é dependente da intensidade do exercício e que há maior formação de amônia em exercícios de alta intensidade, em torno de 70 a 100% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$  (DUDLEY *et al.* 1983; BROBERG; SAHLIN, 1989). Os animais do presente estudo correram em uma esteira rolante em uma velocidade de 21 m/min e inclinação de 5%, o que corresponde à aproximadamente 75%  $\text{VO}_{2\text{máx}}$  de um rato não treinado.

Essa velocidade da esteira foi escolhida para a realização do exercício, pois está dentro da faixa dos estudos que provam que há acúmulo de amônia nessa intensidade. Iniciamos o estudo com uma velocidade de exercício igual a 24 m/min, porém os ratos que recebiam injeção central de amônia corriam menos de 15 min, período insuficiente para coletar todas as amostras de sangue. Assim, a velocidade foi ajustada, mas garantimos que não fosse menor que 50% do  $VO_{2max}$ , pois alguns estudos demonstraram que, nessa intensidade, não há acúmulo de amônia (BABIJ *et al.* 1983; KATZ *et al.* 1986).

A produção de amônia, durante o exercício, provém da desaminação do AMP e do metabolismo de aminoácidos. A segunda fonte é intensificada quando a disponibilidade de piruvato é reduzida, nos casos em que os estoques de glicogênio estão reduzidos (WAGENMAKERS *et al.* 1991). Os ratos do presente estudo tiveram acesso livre à água e ração, o que descarta a possibilidade de maior acúmulo de amônia pela depleção de aminoácidos.

Dessa forma, se houver glicose disponível, haverá piruvato em quantidade suficiente e o grupo amino proveniente da desaminação do glutamato será incorporado ao  $\alpha$ -cetoglutarato formando alanina (WAGENMAKERS *et al.* 1991; WAGENMAKERS, 1998). Teoricamente, quando há aumento da concentração sistêmica de amônia, uma cadeia carbônica pode receber o grupo amino para formar aminoácidos.

Na curva dose-resposta do presente estudo foi medida a concentração de proteínas totais no plasma. Os ratos que receberam amônia a 450 e 750 mM apresentaram maior concentração de proteínas totais, evidenciando que a cadeia carbônica de algum carboidrato recebeu o grupo  $NH_4^+$  excedente e formou uma proteína, afim de diminuir a concentração de amônia. Esses resultados estão de acordo com os achados de Wagenmakers *et al.* (1991) e Snow *et al.* (2000), os quais indicaram que a ingestão de carboidrato, antes de realizar um exercício físico submáximo prolongado, atenua a produção de amônia.

A produção de amônia durante o exercício pode elevar significativamente, em até 90 e 200  $\mu$ M (HELLSTEN *et al.* 1999; DALSGAARD *et al.* 2006; NYBO *et al.* 2005; MOHR *et al.* 2006). No presente estudo, o grupo controle alcançou concentrações iguais a 150  $\mu$ M na interrupção voluntária do esforço. Essa concentração é, 4 vezes maior que aquela observada



em indivíduos saudáveis em repouso (VAN HALL *et al.* 1995; BANGSBO *et al.* 1996) e 5 vezes maior que os valores basais dos ratos que passarem pelo experimento. A única condição conhecida em que tal aumento na concentração de amônia ocorre é na presença de certas complicações patológicas, onde concentrações elevadas do metabólito levam a deteriorações graves na saúde e no bem estar.

Para simular esse aumento, vários estudos utilizam o método *Portacaval shunting*, em que é feita uma cirurgia a qual permite que o sangue flua diretamente para a veia cava, sem passar pelo fígado. A observação de que o estado hiperamonêmico era muitas vezes acompanhado por disfunção neuropsicológica sob a forma de Encefalopatia Hepática, levou muitos pesquisadores concluírem que a amônia tem um grande efeito patogênico (CAULI *et al.* 2006; CAULI *et al.* 2007 a; CAULI *et al.* 2007 b).

O problema desse método é que não ocorre somente hiperamonemia, e sim alterações similares àquelas pessoas que possuem falência hepática, já que o sangue não passa pelo fígado. Como esse órgão é a maior glândula do corpo humano, durante o experimento utilizando *Portacaval shunting*, o armazenamento e a liberação de glicose ficam comprometidos e a síntese de colesterol e proteínas não ocorre como deveria. Portanto, os resultados encontrados nesses artigos podem ser superestimados pela alteração de fatores além do aumento da concentração de amônia.

No presente estudo, optamos por um método de hiperamonemia aguda, assegurando que qualquer efeito observado foi devido somente à alteração na concentração de amônia. Foi dado um mínimo de 48 horas entre cada experimento, tempo suficiente para que os valores plasmáticos voltassem ao normal, já que as concentrações basais não foram diferentes entre as situações experimentais.

Mesmo assim, os estudos citados anteriormente mostram alterações motoras e de coordenação, devido à alteração da neurotransmissão glutamatérgica (CAULI *et al.* 2006; CAULI *et al.* 2007 a; CAULI *et al.* 2007 b). O tecido cerebral, ao contrário do fígado, não possui ciclo da uréia e o sangue “rico” em amônia atravessa a barreira hematoencefálica e é desintoxicado por um processo diferente, em que o glutamato é transformado em glutamina. Esse processo ocorre principalmente nos astrócitos, uma vez que estas células representam os

primeiros pontos de contato para quaisquer substâncias que entram no cérebro (WANG; BORDEY, 2008).

Os astrócitos fornecem proteção para os neurônios e realizam importantes funções metabólicas para auxiliar no processo da neurotransmissão (WANG; BORDEY, 2008). Algumas destas funções estão ilustradas na FIG. 6 da introdução. A amônia incorporada à glutamina desempenha um papel importante no sistema glutamatérgico (FELIPO; BUTTERWORTH, 2002), o glutamato por sua vez atua como um precursor da produção do neurotransmissor inibitório, gama-aminobutíricoácido (GABA), através da ação do ácido glutâmico enzima descarboxilase (BAK *et al.* 2006).

Dessa forma, a amônia influencia vias excitatórias e inibitórias e equilibra a síntese de glutamato e GABA e, concomitantemente, possui um papel importante na manutenção do metabolismo energético neuronal. Conseqüentemente, a sua presença não deve ser considerada, sempre, um efeito patológico. Como os ratos do presente estudo passaram por todas as situações experimentais, não foi possível fazer nenhuma análise no tecido cerebral. Portanto, não é possível descartar a participação de tecidos e órgãos periféricos nas respostas analisadas.

Observamos um aumento na concentração de glutamato no minuto 5 e na interrupção voluntária do esforço (GRAF. 10), mostrando que esse sistema de diminuição da concentração de amônia pelo aumento da síntese de glutamato é ativado durante o exercício. No entanto, esse sistema não foi ativado, durante o repouso, como pode ser visto no GRAF. 7, apesar de que, no experimento da curva dose-resposta, foi observado um aumento na concentração de proteínas totais (GRAF. 2B). Provavelmente, durante o repouso, o mecanismo responsável pela diminuição da concentração de amônia não seja predominante pelo aumento da concentração de glutamato, mas sim de outros aminoácidos que não foram dosados, como alanina, glicina, prolina, conforme sugerido pela FIG. 5.

Outra hipótese que pode explicar porque não foi encontrada diferença significativa na concentração de glutamato durante o repouso é que para diminuir a concentração de amônia, o glutamato recebe um grupo  $\text{NH}_4^+$  e é convertido em glutamina, talvez por causa dessa conversão, a concentração de glutamato estava baixa. Como, durante o exercício, o aumento da concentração de amônia é bem maior que durante o repouso, ambos, o glutamato e a

glutamina, permanecem elevados. Isso pode explicar a diferença encontrada durante o exercício e que não foi encontrada durante o repouso.

Uma pequena porção da amônia pode estar envolvida na manutenção do equilíbrio energético, através de um *shuttle* alanina / amônia (COLES *et al.* 2008). Este mecanismo proposto recentemente sugere que o piruvato fornecido após a glicólise é convertido em alanina, em uma reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase (TSACOPOULOS *et al.* 1997; COLES *et al.* 2008). A alanina, por sua vez, pode ser transportada dos astrócitos para os neurônios, onde é novamente convertida em piruvato, que é oxidado no metabolismo neuronal (COLES *et al.* 2008). No presente estudo a concentração de alanina não foi medida, mas a conversão de alanina em piruvato pode ser um mecanismo significativo para diminuir a concentração cerebral e sistêmica de amônia.

Utilizando o método *Portacaval shunting*, foi observada uma diminuição significativa na atividade locomotora nos ratos em comparação com o grupo controle. Esta hipolocomoção está correlacionada com o aumento da concentração de glutamato extracelular (CAULI *et al.* 2006; CAULI *et al.* 2007 a; CAULI *et al.* 2007 b) e é provável que a amônia é a causadora da alteração locomotora. Estas evidências apontam que a amônia possui um efeito neurotóxico, podendo influenciar no tempo total do exercício; portanto, há uma ligação entre o acúmulo de amônia e a interrupção voluntária do esforço. Corroborando esses achados, no presente estudo, os ratos que receberam injeção central de amônia apresentaram menor tempo total de exercício (GRAF. 11) e, apesar de não ter sido realizada uma medida eficaz, permaneciam também mais tempo no choque que os ratos que recebiam injeção de salina ou lactato.

#### **4.2 Alteração na concentração plasmática de lactato**

Durante o repouso, a injeção central de lactato aumentou a concentração do mesmo no plasma nos grupos que receberam 2, 8 e 15 mM de lactato quando comparado a situação controle, como se pode observar no GRAF. 3B. Esse aumento foi de 0,1 mM, 0,32 mM e 0,5 mM respectivamente, um aumento menor do que o esperado. Pesquisas anteriores demonstraram que o cérebro é flexível na utilização de lactato como fonte de energia, quando ocorre aumento de sua disponibilidade e concomitante. A utilização do lactato como fonte de energia

está associada à diminuição da captação de glicose (IDE *et al.* 2000; KEMPPAINEN *et al.* 2005; SCHURR, 2006; VAN HALL *et al.* 2009).

O tecido cerebral, incluindo os astrócitos (DRINGEN *et al.* 1993), possui a capacidade de utilizar o lactato como fonte de energia, que pode contribuir em até 25% da energia total demandada. Ao contrário, a oxidação do metabólito no músculo em repouso não aumenta com a elevação de sua concentração (ROWELL *et al.* 1965; KELLEY *et al.* 2002).

No presente estudo, como o aumento foi menor do que o esperado, o lactato pode ter sido oxidado no cérebro durante o repouso, já que o substrato não se acumula no tecido cerebral (LEEGSMA-VOGT *et al.* 2004). Porém, ao contrário dos estudos citados, de acordo com o GRAF. 1A e 5A, não houve diferença na concentração de glicose, mesmo quando houve aumento na concentração central e sistêmica de lactato. A ausência do efeito pode ser explicada pela grande variação na concentração de glicose entre os ratos.

Segundo Rasmussen *et al.* (2009) quando há maior disponibilidade de lactato ocorre uma pequena diminuição da concentração de glicose no plasma; para que isso aconteça, no entanto, a disponibilidade de lactato deve se elevar muito para produzir uma pequena variação na oxidação de glicose. Dessa forma, o lactato não pode substituir completamente a glicose. Em concentrações plasmáticas de lactato moderadas (~ 4 mM), quase todo o lactato transportado é oxidado, mas a contribuição efetiva dessa oxidação para suprir a energia cerebral é insignificante (RASMUSSEN *et al.* 2009).

No cérebro, o lactato é transportado entre neurônios e astrócitos, como proposto por Pellerin e Magistretti (1994). Como publicado inicialmente (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994) os neurônios podem usar o lactato fornecido pelos astrócitos. A hipótese propõe um seqüência causal dos acontecimentos: o glutamato liberado na fenda sináptica é absorvido pelos astrócitos, que circundam o complexo sináptico. A absorção de Na<sup>+</sup> dependente de glutamato estimula a bomba Na/K ATPase, o que eleva o consumo de glicose. A glicose é utilizada na via glicolítica; o lactato resultante é exportado, sendo então utilizado na fosforilação oxidativa nos neurônios.

Assim, a alteração da concentração de lactato é acompanhada por alterações na concentração de glutamato. Em experiências *in vivo*, ao se infundir glutamato, ocorreu aumento na

concentração de lactato (DEMESTRE *et al.* 1997), enquanto a infusão local de inibidores do transporte de glutamato reduziu (FRAY *et al.* 1996) ou aboliu (DEMESTRE *et al.* 1997) o aumento da concentração do lactato.

Em outros estudos *in vitro*, a absorção de lactato em neurônios do hipocampo foi relacionada à proteção das funções neuronais durante a incubação de glutamato à 20 mM (SCHURR *et al.* 1999). Durante a ocorrência de lesões cerebrais (NIELSEN *et al.* 1999), o aumento de glutamato é acompanhado por um aumento na concentração de lactato e uma queda na glicose. Em um estudo anterior, utilizando ratos anestesiados que foram submetidos à infusão de 500 mM de glutamato por uma sonda de microdiálise, houve aumento de lactato, diminuição na glicose e a ocorrência de uma lesão em torno da sonda (ROS *et al.* 2001). Portanto, o lactato exerce um papel protetor contra a neurotoxicidade do glutamato.

Durante o repouso, nenhuma alteração na concentração de glutamato foi encontrada (GRAF. 7), porém, nos estudos citados anteriormente (ALESSANDRI *et al.* 1996; NIELSEN *et al.* 1999; SCHURR *et al.* 1999) a perfusão de glutamato causou inflamação e aumento da concentração de lactato após, no mínimo, 4 horas do início do experimento. Isso sugere que o tempo de coleta do presente estudo não foi suficiente para visualizar esses resultados.

Nos seres humanos, o cérebro capta lactato quando a concentração do mesmo aumenta como visto durante exercícios de alta intensidade (IDE *et al.* 2000). Durante o exercício progressivo, a concentração arterial do lactato aumenta exponencialmente com a intensidade de trabalho (GLADDEN *et al.* 2004), podendo chegar a 15 mM em humanos (NIELSEN, 1999). Diferentemente, no presente estudo, em que os experimentos foram conduzidos em ratos submetidos à corrida de velocidade constante, a concentração de lactato atingiu um valor máximo de 5 mM no grupo controle.

Já o grupo que recebeu injeção central de lactato teve um aumento de 1 mM da concentração plasmática de lactato em comparação com os outros grupos e esse aumento não pode ser explicado somente pela injeção, como pode ser visto no GRAF. 8B. É possível que tanto o grupo controle quanto o grupo que recebeu lactato produziram, periféricamente, a mesma quantidade de lactato. Parte do lactato do grupo controle foi consumido pelo cérebro, pois já foi comprovado que alguma fração do lactato produzido pelo músculo, durante a atividade física, é oxidado no cérebro (AHLBORG *et al.* 1986).

Porém, a baixa capacidade de transporte de lactato da barreira hematoencefálica limita sua utilização no cérebro (CREMER *et al.* 1976). Esse transporte é facilitado pela proteína monocarboxilato e é encontrada em células do endotélio cerebral (GERHART *et al.* 1997). Mesmo com a presença desse transportador, Van Hall *et al.* (2009) infundiram lactato por 90 min e mostraram que a única maneira de manter o gradiente do mesmo através da barreira hematoencefálica seria se todo o lactato cerebral fosse oxidado, de forma que as suas concentrações permaneceram baixas, mantendo o transporte do mesmo.

Em seres humanos, se a concentração de lactato no fluido cérebro espinhal ultrapassar de 3 mM (ABI-SAAB *et al.* 2002), o MCT localizado na barreira hematoencefálica provavelmente removerá o lactato, para evitar o seu acúmulo no cérebro (REDZIC, 2011). Dessa forma, se o lactato cerebral já estiver em concentrações altas, como ocorre no grupo que recebeu lactato intracerebroventricular, o metabólito não consegue entrar no SNC e o excedente permanece no plasma. Isso explica parcialmente porque foi detectado um aumento de 1 mM de lactato quando comparado com o grupo controle. Tendo esse achado como apoio, Dienel (2004) sugerem que, como a barreira hematoencefálica restringe o transporte de substratos para o cérebro, muitos compostos que são metabolizados nos experimentos que usam métodos de cultura de células, podem não simbolizar o que acontece de fato em um experimento *in vivo*.

A noção de que o lactato é formado como resultado da falta de oxigênio no músculo é atribuída ao trabalho de Louis Pasteur no século XVIII. As primeiras medidas realizadas *in situ*, em 1907, demonstraram que, quando os músculos de rã foram estimulados, ocorreu acúmulo de lactato e, quando foi adicionado oxigênio à preparação, o resultado foi atenuado.

Apesar dessas observações, os conceitos da oxidação e produção de lactato já foram confrontados e a produção de lactato não é mais relacionado com ausência de oxigênio. Brooks *et al.* em 1985 introduziu a hipótese que hoje é conhecida como “*lactate shuttles*”, em que a formação do lactato e sua posterior distribuição por todo o corpo é um importante mecanismo para manter o suporte energético nos tecidos. Desde sua introdução, essa hipótese tem sido corroborada por diversos estudos, os quais utilizaram uma grande variedade de métodos. Durante a ativação cerebral ocorre aumento significativo na concentração de lactato no córtex (SAPPEY-MARINIER *et al.* 1992). Igualmente, ocorre aumento extracelular de lactato em áreas motoras, durante o exercício (DE BRUIN, 1990). O papel neuroprotetor do

lactato é atribuído à sua habilidade de aumentar a demanda energética dos neurônios (ROS *et al.* 2001).

### 4.3 Alteração na concentração plasmática de amônia e lactato

Durante o repouso, após 5, 15 e 20 minutos da injeção central de lactato foi observado uma menor concentração de amônia (GRAF. 5B). No SNC, o lactato foi utilizado provavelmente para “tamponar” a amônia, e, por isso, foram observadas menores concentrações desse metabólito. Corroborando esse achado, ao se injetar amônia intracerebroventricularmente, verificamos a diminuição da concentração de lactato (GRAF. 6).

Um dos primeiros estudos a observar a dinâmica entre o lactato e a amônia foi realizado por Alex *et al.* (1989). O estudo mostrou que ocorre uma diminuição na concentração de lactato na presença de altas concentrações de amônia. Do mesmo modo, McQueen e Bailey (1990a; 1990b) relataram diminuições na produção de lactato proveniente de glicose e na produção de amônia proveniente de glutamina na presença de altas concentrações de amônia.

De acordo com a hipótese da “Lançadeira de Lactato Astrócito-Neurônio”, a glicose é consumida pelos astrócitos e, do mesmo modo que ocorre no músculo, há uma maior formação de lactato dependendo do fornecimento de energia. O lactato, por sua vez, é transportado para o meio extracelular e captado pelos neurônios. Visto que os neurônios não realizam gliconeogênese, o lactato é convertido em piruvato (PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994; BAK *et al.* 2006).

Se há maior concentração de amônia, o piruvato capta essa amônia e é convertido em alanina ou entra no ciclo do ácido cítrico e o  $\alpha$ -cetogluturato formado capta um grupo amino e é convertido em glutamato. Posteriormente, o glutamato formado pode se converter em glutamina ao captar mais um grupo amino (SUAREZ *et al.* 2002).

No presente estudo, optamos por medir a concentração de glutamato, mas não houve diferença estatística entre as situações nos animais submetidos ao repouso. Essa diferença foi observada somente durante o exercício, quando foram encontradas maiores concentrações de

glutamato após 5 minutos e na interrupção voluntária do esforço nos ratos que receberam amônia, como se pode observar no GRAF. 10.

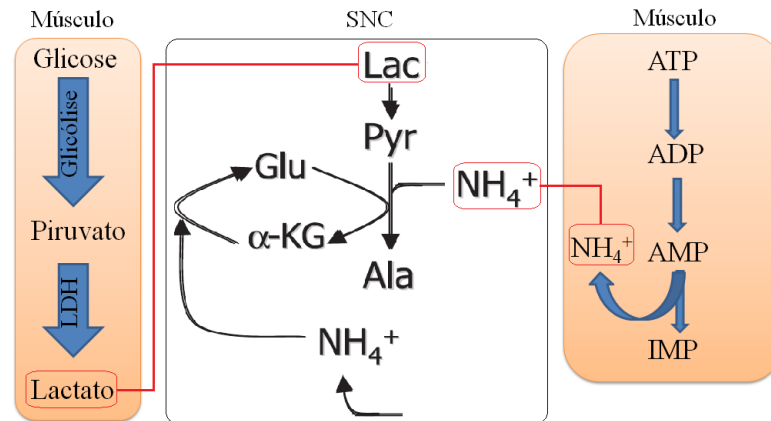
O glutamato é um aminoácido essencial para muitos processos metabólicos no cérebro e no músculo esquelético (MOURTZAKIS *et al.* 2002). Não só participa na transaminação da cadeia ramificada de aminoácidos, mas também é fundamental para a formação de aspartato, amônia, alanina e glutamina (WAGENMAKERS, 1998; GRAHAM *et al.* 1997). Como durante o exercício existe uma liberação elevada desse metabólito, isso sugere que o glutamato desempenhe um papel importante na transferência de grupos amino e no ciclo de TCA (GRAHAM *et al.* 1995).

Dessa forma, o aumento da concentração de glutamato observada no GRAF 10 sugere uma tentativa do organismo para diminuir a concentração de amônia. Para formar mais glutamato é necessário que o lactato seja convertido em  $\alpha$ -cetogluturato, o que explica a diminuição da concentração de lactato no grupo que recebeu injeção central de amônia.

No presente estudo, as mesmas alterações que ocorreram no grupo repouso também ocorreram no grupo exercício. De acordo com o GRAF 9, ao injetar amônia os ratos apresentaram menores valores de lactato e, ao injetar lactato, foram encontrados menores concentrações de amônia (GRAF 8B). Ozturk *et al.* (1992) relataram aumento da degradação de glicose, glutamina e amônia na presença de altas concentrações de lactato. Especificamente, a síntese de amônia também diminuiu 64% na presença de lactato (OZTURK *et al.* 1992).

Juntando os resultados, podemos comprovar a idéia de Pellerin e Magistretti (1994) *in vivo* em uma seqüência causal de acontecimento: o lactato é convertido em piruvato que capta um grupo amino e é convertido em alanina ou é convertido em  $\alpha$ -cetogluturato que capta outro grupo amino e é transformado em glutamato. Com isso, ocorre maior concentração de glutamato (GRAF 10) a fim de diminuir a concentração de amônia e conseqüente diminuição da concentração de lactato.





**FIGURA 12** - Esquema da hipótese do presente estudo: o lactato e a amônia produzidos no músculo é transportado através da corrente sanguínea até o SNC. O lactato então é convertido em piruvato que capta um grupo amino e é convertido em alanina ou é convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato que capta outro grupo amino e é transformado em glutamato. FONTE: Produção do próprio autor.

Ozturk *et al.* (1992) relataram um aumento no metabolismo de aminoácidos na presença de amônia, além de uma mudança na via de produção de glutamato/glutamina. Zwingmann *et al.* (2003), ao estudar pacientes com insuficiência hepática aguda que possuem altas concentrações de amônia, observaram um aumento na concentração cerebral de glutamato e alanina e aumento da síntese de lactato.

Embora exista a teoria que o aumento da amônia leve à fadiga, tal como proposto por Banister e Cameron (1990), há ainda lacunas que não podem ser explicadas completamente. Barnes *et al.* (1964) identificaram que uma redução de amônia na corrente sanguínea foi acompanhada por um aumento no desempenho físico, levando a um maior tempo total de exercício. Há uma série de métodos usados para reduzir a concentração de amônia, durante o exercício, como o treinamento (BARNES *et al.* 1964.), a suplementação de aspartato (BARNES *et al.* 1964; AHLBORG *et al.* 1986) e a suplementação de glutamato (BRODAN *et al.* 1974). Como esses métodos mostraram uma redução no acúmulo de amônia acompanhado por aumento do tempo total de exercício, formaram-se evidências indiretas apoiando a hipótese que a fadiga e amônia poderiam estar associadas (MUTCH; BANISTER, 1983).

Estudos usando suplementação nutricional, por um lado, não apresentam resultados consistentes. Acredita-se que a suplementação com aspartato aumente sua disponibilidade para ureiogênese no fígado e, conseqüentemente, promova maior remoção de amônia (BARNES *et al.* 1964). Nybo *et al.* (2005) descobriram que, após o exercício submáximo, as concentrações de amônia arterial foram  $56 \pm 13$  e  $190 \pm 44$   $\mu\text{M}$  nos indivíduos treinados e não

treinados, respectivamente. Embora esses dados representem apenas um aumento na concentração arterial no grupo não treinado, houve ainda um aumento de amônia no fluido cerebro espinhal, partindo de um valor igual a zero durante o repouso para uma absorção de  $3,7 \pm 1,3 \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$  após 3 horas de exercício (NYBO *et al.* 2005).

Há evidências, em modelo animal, que concentração cerebral de amônia durante o exercício prolongado pode interferir o metabolismo de neurotransmissores, isto é, nas concentrações dos neurotransmissores excitatórios e inibitórios glutamato e GABA (GUEZENNEC *et al.* 1998). No entanto, não há evidências diretas em humanos, embora os efeitos do aumento da concentração de amônia pareçam ser maiores no cérebro nas áreas envolvidas na aprendizagem, na memória e no controle motor (CAULI *et al.* 2009; MONFORT *et al.* 2009).

No presente estudo, os ratos que receberam injeção central de amônia tiveram menor tempo total de exercício quando comparado com os ratos que receberam lactato, mas o desempenho desses grupos não foi diferente do grupo controle. Vale ressaltar que o objetivo central do experimento foi analisar as mudanças da concentração de lactato e amônia e, inicialmente, não era relevante a interferência desses metabólitos no desempenho.

Para analisar corretamente tal alteração, o “n” utilizado deveria ser maior, já que o coeficiente de variação do tempo total de exercício é superior ao coeficiente usado para calcular a quantidade amostral do estudo. Mesmo assim, há evidências no GRAF. 11 de que os metabólitos influenciam na interrupção voluntária do esforço, mas esse efeito não é conclusivo.

## **5 CONCLUSÃO**

A concentração de amônia na interrupção voluntária do esforço em ratos não diferiu daquelas encontradas nos casos patológicos, porém não houve nenhum dano ao organismo, já que o lactato reduziu os efeitos da hiperamonemia no metabolismo energético.

Foi estabelecida, então, uma relação entre aumento na produção de amônia no exercício e o uso de lactato como protetor contra este aumento, pois ao injetar amônia os ratos apresentaram menores valores de lactato e, ao injetar lactato, foram encontrados menores concentrações de amônia. Especificamente, o lactato contrabalança os efeitos da hiperamonemia no metabolismo energético no SNC.

## REFERÊNCIAS

AHLBORG, B.; EKELUND, L.G.; NILSSON, C.G. Effect of potassium-magnesiumaspartate on the capacity for prolonged exercise in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.74, p.238, 1986.

ALEX, P.C.; BARNGROVER, D.; SWARTZ, R.W. Development of a small scale model to investigate the rate limiting kinetics of C127 anchorage-dependent cells during perfusion. Paper presented at **ACS National Meeting in Miami, FL**, 1989.

ALISON, M. R. et al. Hepatic stem cell: from inside and outside the liver? **Cell Proliferation**, v.37, p.1221, 2002.

ALMEIDA, R.D. *et al.* Acute supplementation with keto analogues and amino acids in rats during resistance exercise. **British Journal of Nutrition**, v.104, p.1438-1442, 2010.

ALTENBERG, G. A. *et al.* The engine of ABC proteins. **News in Physiological Sciences**, v.18, p.191, 2003.

ABI-SAAB, W.M. *et al.* Striking differences in glucose and lactate levels between brain extracellular fluid and plasma in conscious human subjects: effects of hyperglycemia and hypoblycemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 22, p. 271, 2002.

BABIJ, P.; MATTHEWS, S.; RENNIE, M. Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man. **European Journal of Applied Physiology**, v.50, p.405–411, 1983.

BACHMANN, C. Mechanisms of Hyperammonemia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.40, p.653-662, 2002.

BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, p.641-653, 2006.

BALMACEDA-AGUILERA, C. *et al.* Glucose transporter 1 and monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 localization within the glial cells of shark blood-brain-barriers. **Plos One**, v., p.32409, 2012.

BANGSBO, J.; KIENS, B.; RICHTER, E. A. Ammonia uptake in inactive muscles during exercise in humans. **American Journal of Physiology**, v.270, p.E101–E106, 1996.

BANISTER, E.; CAMERON, B. Exercise-induced hyperammonemia: peripheral and central effects. **International Journal of Sports Medicine**, v.11, p.129-142, 1990.

BARNES, R. H. *et al.* Effects of exercise and administration of aspartic acid on blood ammonia in the rat. **American Journal of Physiology -- Legacy Content**, v.207, p.1242–1246, 1964.

BERTHET, C. *et al.* Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.29, p.1780-1789, 2009.

BLOMSTRAND, E.; SALTIN, B. Effect of muscle glycogen on glucose, lactate and amino acid metabolism during exercise and recovery in human subjects. **The Journal of Physiology**, v.514, p.293-302, 1999.

BONEN, A. *et al.* Short-term training increases human muscle MCT1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. **American Journal of Physiology**, v.274, p.102-107, 1998.

BORNEMANN, A.; ANDERSON, L. V. Diagnostic protein expression in human muscle biopsies. **Brain Pathology**, v.10, p.193-214, 2000.

BOSCÁ, L.; ARAGÓN, J. J.; SOLS, A. Modulation of muscle phosphofructokinase at physiological concentration of enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.260, p.2100-2107, 1995.

BOUZIER, A. K. *et al.* The Metabolism of [3-13C]Lactate in the Rat Brain Is Specific of a Pyruvate Carboxylase-Deprived Compartment. **Journal of Neurochemistry**, v.75, p.480-486, 2000.

BOUZIER-SORE, A. K. *et al.* Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. **European Journal of Neuroscience**, v.24, p.1687-1694, 2006.

BROBERG, S.; SAHLIN, K. Adenine nucleotide degradation in human skeletal muscle during prolonged exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.67, p.116-122, 1989.

BRODAN, V. *et al.* Effects of sodium glutamate infusion on ammonia formation during intense physical exercise in man. **Nutrition Reports International**, v. 9, p.223–232, 1974.

BROMBERG, P. A.; ROBIN, E. D.; FORKNER JR., C.E. The existence of ammonia in blood in vivo with observations on the significance of the NH<sub>4</sub> plus minus NH<sub>3</sub> system. **The Journal Clinical Investigation**, v.39, p.332–341, 1960.

BROOKS, G. A. Lactate: glycolytic end product and oxidative substrate during sustained exercise in mammals. The 'Lactate Shuttle'. Circulation, respiration, and metabolism: current comparative approaches. **Springer**, p.208-18, 1985.

CAPIAUMONT, J. *et al.* Methods for reducing the ammonia in hybridoma cell-cultures. **Journal of Biotechnology**, v.39, p.49-58, 1995.

CARVALHO-PEIXOTO, J.; ALVES, R. C.; CAMERON, L. C. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance fiels exercise. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v.32, p.1186-1190, 2007.

CAULI, O. *et al.* Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. **Journal of Hepatology**, v.45, p.654-661, 2006.

CAULI, O. *et al.* Motor activity is modulated via different neuronal circuits in rats with chronic liver failure than in normal rats. **European Journal of Neuroscience**, v.25, p.2112–2122, 2007(a).

CAULI, O. *et al.* Hyperammonaemia alters the mechanisms by which metabotropic glutamate receptors in nucleus accumbens modulate motor function. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, p.38–46, 2007(b).

CAULI, O. *et al.* Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. **Metabolic Brain Disease**, v.24, p.69–80, 2009.

CHEN, P.; HARCUM, S. W. Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. **Journal of Biotechnology**, v.117, p.277-86, 2005.

CHOI, C. S. *et al.* Lactate induces insulin resistance in skeletal muscle by suppressing glycolysis and impairing insulin signaling. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.283, p.E233-E240, 2002.

CREMER, J. E. *et al.* Changes during development in transport processes of the blood-brain barrier. **Biochim Biophys Acta**, v.448, p.633, 1976.

COLES, J.A.; MARTIEL, J.L.; LASKOWSKA, K. A glia-neuron alanine/ammonium shuttle is central to energy metabolism in bee retina. **Journal Physiology Online**, v.586, p.2077–2091, 2008.

DALSGAARD, M. K. *et al.* A reduced cerebral metabolic ratio in exercise reflects metabolism and not accumulation of lactate within the human brain. **The Journal of Physiology**, v.554, p.571, 2004.

DALSGAARD, M. K. Fuelling cerebral activity in exercising man. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 26, p. 731-750, 2006.

DE GROOT, J. The rat forebrain stereotaxic coordinates. **Proc. K. Ned. Wet.**, v. 62, p.40, 1959.

DE BRUIN, L. A. Effects of stress and exercise on rat hippocampus and striatum extracellular lactate. **American Journal of Physiology**, v.259, p.R773, 1990.

DEMESTRE, M. *et al.* Stimulated release of lactate in freely moving rats is dependent on the uptake of glutamate. **Journal of Physiology**, v.499.3, p.825, 1997.

DIENEL, G. A. Lactate muscles its way into consciousness: fueling brain activation. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.287, p.R519–R521, 2004.

DRINGEN, R. *et al.* Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply in neighboring cells. **Brain Research**, v. 623, p.208, 2003.

DUDLEY, G. A. *et al.* Muscle fiber composition and blood ammonia levels after intense exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v.54, p.582–586, 1983.

FATTOR, J. A. *et al.* Catecholamine response is attenuated during moderate-intensity exercise in response to the “lactate clamp”. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.288, p.E143–E147, 2004.

FRAY, A. E. *et al.* The mechanisms controlling physiologically stimulated changes in rat brain glucose and lactate: a microdialysis study. **The Journal of Physiology**, v.496, p.49, 1996.

FELIPO, V.; BUTTERWORTH, R. F. Mitochondrial dysfunction in acute hyperammonemia. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 487–491, 2002.

GERHART, Z. D. Expression of monocarboxylate transporter MCT by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 36, p.207, 1997.

GLADDEN, L.B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millenium. **The Journal of Physiology**, v.558.1, p.5-30, 2004.



GRAHAM, T. E.; PEDERSEN P. K.; SALTIN, B. Muscle and blood ammonia and lactate responses to prolonged exercise with hyperoxia. **Journal of Applied Physiology**, v.63, p.1457-1462, 1987.

GRAHAM, T.E. *et al.* Training and muscle ammonia and amino acid metabolism in humans during prolonged exercise. **The Journal of Physiology**, v.78, p.725–735, 1995.

GREEN, H. *et al.* Increases in muscle MCT are associated with reductions in muscle lactate after a single exercise session in humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.282, p.154, 2002.

GUEZENNEC, C.Y. *et al.* Effects of prolonged exercise on brain ammonia and amino acids. **International Journal of Sports Medicine**, v.19, p.323–327, 1998.

GUYTON, C. A.; HALL, E. J. **Tratado de fisiología médica**. 11.ed. Elsevier, 2006.

HASSELL, T.; BUTLER, M. Adaptation to non-ammoniogenic medium and selective substrate feeding lead to enhanced yields in animal cell cultures. **Journal of Cell Science**, v. 96, p.501-508, 1990.

HASSELL, T.; GLEAVE, S.; BUTLER, M. Growth-inhibition in animal-cell culture – the effect of lactate and ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.30, p.29-41, 1991.

HAUSSINGER, D. Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureogenesis in perfused rat liver. **European Journal of Biochemistry**. 133, 269–275, 1983.

HAUSSINGER, D.; LAMERS, W. H.; MOORMAN, A. F. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of amino acids and ammonia. **Enzyme**, v.46, p.72–93, 1992.

HELLSTEN, Y. *et al.* AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. **Journal of Physiology**, v.520.3, p.909-920, 1999.

HOWLETT, R. A. *et al.* Regulation of skeletal muscle glycogen phosphorylase and PDH at varying exercise power outputs. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.275, p.418, 1998.

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

JAYAKUMAR, R.; SUJATHA, R.; PAUL, V. Effect of Ammonia on Motor Function in Adult Rats. **Brain Research Bulletin**, v.43, p.275-278, 1997.

KADOWAKI, M. *et al.* Amino acids as regulators of proteolysis. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2053, 2003.

KATAYAMA, K. Ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. **Hepatology Research**, v.30, p.73–80, 2004.

KATZ, A. *et al.* A Muscle ammonia and amino acid metabolism during dynamic exercise in man. **Clinical Physiology**, v.6, p.365, 1986(a).

KATZ, A.; SAHLIN, K.; HENRIKSSON, J. Muscle ammonia metabolism during isometric contraction in humans. **American Journal of Physiology**, v.250, p.834-840, 1986(b).

KELLEY, K. M. *et al.* Lactate metabolism in resting and contracting canine skeletal muscle with elevated lactate concentration. **Journal of Applied Physiology**, v.93, p.865-872, 2002.

KEMPPAINEN, J. *et al.* High intensity exercise decreases global brain glucose uptake in humans. **The Journal of Physiology**, v.568.1, p.323–332, 2005.

LEMON, P.W.R.; MULLIN, J.P. Effect of initial muscle glycogen levels on protein catabolism during exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.48(4), p.624-629, 1980.

LEESMA-VOGT, G. Evidence for a lactate pool in the rat brain that is not used as an energy supply under normoglycemic conditions. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 23, p. 933 – 941, 2003.

LIMA, N.; COIMBRA, C.; MARUBAYASHI, U. Effects of intracerebro-ventricular injection of atropine on metabolic responses during exercises in untrained rats. **Physiology & Behavior**, v.64, p.69-74, 1999.

LIMA, N.R.V. *et al.* Prolactin release during exercise in normal and adrenodemedullated untrained rats submitted to central blockade with atropine. **Hormones and Behavior**, v.40, p. 526, 2001.

LOMBARDI, A. *et al.* Hyperlactatemia reduces muscle glucose uptake and GLUT-4 mRNA while increasing (E1a)PDH gene expression in rat. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.276, p.922, 1999.

LOWENSTEIN, J. M. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. **Physiological Reviews**, v.52, p.382, 1972.

MARCAGGI, P.; COLES, J.A. Ammonium in nervous tissue: transport across cell membranes, fluxes from neurons to glial cells, and role in signalling. **Progress in Neurobiology**, v.64, p.157–183, 2001.

MCLIMANS, W. *et al.* Ammonia loading in cell culture systems. **Cell Biology International Reports**, v.5, p.653-660, 1991.

MCQUEEN, A.; BAILEY, J. E. Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma cell metabolism and antibody production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.1067, 1990(a).

MCQUEEN, A.; BAILEY, J. E. Mathematical modeling of the effects of ammonium ion on the intracellular pH of hybridoma cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.897, 1990(b).

MIEYER, R. A.; TERJUNG, R. L. Differences in ammonia and adenylate metabolism in contracting fast and slowA muscle. **American Journal of Physiology**, p.6, p.111, 1979.

MILLER, B. F. *et al.* Lactate and glucose interactions during rest and exercise in men: effect of exogenous lactate infusion. **The Journal of Physiology**, v.544, p.963-975, 2002.

MOHR, M. *et al.* Environmental heat stress, hyperammonemia and nucleotide metabolism during intermittent exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.97, p.89-95, 2006.

MONFORT, P. *et al.* Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: therapeutical implications. **Neurochemistry International**, v.55, p.106–112, 2009.

MOURTZAKIS, M.; GRAHAM, T.E. Glutamate ingestion and its effects at rest and during exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v.93, p.1251–1259, 2002.

MUÑOZ, M. *et al.* Hyperammonemia Impairs NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation in the CA1 of Rat Hippocampus In Vitro. **Neurochemical Research**, v.25, p.437, 2000.

MUTCH, B. J. C.; BANISTER, E.W. Ammonia metabolism in exercise and fatigue: a review. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.15, p.41–50, 1983.

NIELSEN, H. B. R.; BOUSHEL, P.; SECHER, N. H. Cerebral desaturation during exercise reversed by O<sub>2</sub> supplementation. **American Journal of Physiology**, v.277, p.1045, 1999.

NYBO, L *et al.* Cerebral ammonia uptake and accumulation during prolonged exercise in humans. **The Journal of Physiology**, v.563.1, p.285, 2005.

O'BRIEN, J. *et al.* Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. **Neurochem. Res.**, v. 32, p. 597 – 607, 2007.

OGUSHI, S. *et al.* A new transient activator of phosphofructokinase during initiation of rapid glycolysis in brain. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265, p.10943, 1990.

OJA, S. S.; BONSDORFF, H. A. R. V.; LINDROOS, O. F. C. Ammonia Content of the Developing Rat Brain. **Nature**, v.212, p.937, 1966.

OLDE DAMINK, S.W.; JALAN, R.; DEJONG, C.H. Interorgan ammonia trafficking in liver disease. **Metabolic Brain Disease**, v.24, p.169, 2009.

OLDE DAMINK, S. W. M. *et al.* Interorgan ammonia metabolism in liver failure. **Neurochemistry International**, v.41, p.177, 2002.

OZTURK, S. S.; RILEY, M. R.; PALSSON O. B. Effects of Ammonia and Lactate on Hybridoma Growth, Metabolism, and Antibody Production. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, p.418, 1992.

PAROLIN, M. L. *et al.* F. Regulation of glycogen phosphorylase and PDH during exercise in human skeletal muscle during hypoxia. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.278, p.522, 2000.

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.10625, 1994.

PÉRONNET, F. *et al.* Respective oxidation of <sup>13</sup>C-labeled lactate and glucose ingested simultaneously during exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.82, p.440, 1997.

PERRIELLO, G. *et al.* Estimation of glucose-alanine-lactate-glutamine cycles in postabsorptive humans: role of skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.269, p.443, 1995.

PIRES, W. *et al.* Intracerebroventricular physostigmine enhances blood pressure and heat loss in running rats. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, p. 3, 2007.

PURZYCKA, J. AMP and adenosine aminohydrolases in rat tissues. **Acta Biochim**, v.9, p.83, 1962.

RAE, C.; NASRALLAH, F. A.; BRÖER, S. Metabolic effects of blocking lactate transport in brain cortical tissue slices using an inhibitor specific to MCT1 and MCT2. **Neurochemical Research**, v.34, p.1783, 2009.

RASMUSSEN, P. *et al.* Coupling between the blood lactate to pyruvate ratio and MCA V<sub>mean</sub> at the onset of exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v.107, p.1799, 2009.

REDZIC, Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. **Fluids Barriers in CNS**, v.8, p.3, 2011.

ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.287, p.502-516, 2004.

ROEF, M. J. *et al.* Gluconeogenesis in humans with induced hyperlactatemia during low-intensity exercise. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.284, p.1162, 2003.

ROS, J. *et al.* Lactate reduces glutamate-induced neurotoxicity in rat cortex. **Journal of Neuroscience Research**, v.66, p.790-794, 2001.

ROWELL, L. B. *et al.* Hepatic clearance of indocyanine green in man under thermal and exercise stresses. **Journal of Applied Physiology**, v.20, p.384-394, 1965.

SAHLIN, K. *et al.* Lactate content and pH in muscle samples obtained after dynamic exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.367, p.143-149, 1976.

SAHLIN, K.; KATZ, A.; HENRIKSSON, J. Redox state and lactate accumulation in human skeletal muscle during dynamic exercise. **Biochemical Journal**, v.245, p.551, 1987.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. 3. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.

SANDS, J. M. Mammalian urea transporters. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p.543, 2003.

SCHURR, A. Lactate: a major and crucial player in normal function of both muscle and brain. **The Journal of Physiology**, v.586.11, p.2665, 2008.

SCHURR, A. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.26, p.142-152, 2006.

SCHURR, A. *et al.* An increase in lactate output by brain tissue serves to meet the energy needs of glutamate-activated neurons. **The Journal of Neuroscience**, v.19, p.34, 1999.

SNOW, R. J. *et al.* Effect of carbohydrate ingestion on ammonia metabolism during exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v.88, p.1576, 2000.

SAPPEY-MARINIER, D. *et al.* Effect of photic stimulation on human visual cortex lactate and phosphates using <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.12, p.584,1992.

SUÁREZ, I.; BODEGA G.; FERNÁNDEZ B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. **Neurochemistry International**, v.41, p.123, 2002.

SUZUKI, A. *et al.* Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. **Cell**, v.144, p.810, 2011.

TERJUNG, R.L.; TULLSON, P.C. Ammonia metabolism during exercise. In: Perspectives in Exercise Science and Sports Medicine. **Energy Metabolism in Exercise and Sport**, v.5, 1992.

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

TONOUCHI, M. *et al.* Muscle contraction increases lactate transport while reducing sarcolemmal MCT4, but not MCT1. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.282, p.1062, 2002.

TSACOPOULOS, M.; POITRY-YAMATE, C .L.; POITRY, S. Ammonium and glutamate released by neurons are signals regulating the nutritive function of a glial cell. **The Journal of Neuroscience**, v.17, p.2383, 1997.

VAN DE POLL, M. C. *et al.* Renal metabolism of amino acids: its role inter organ amino acid exchange. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.185, 2004.

VAN HALL, G. *et al.* Deamination of amino acids as a source for ammonia production in human skeletal muscle during prolonged exercise. **The Journal of Physiology**, v.489, p.251, 1995.

VAN HALL1, G. *et al.* Blood lactate is an important energy source for the human brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.29, p.1121, 2009.

WAGENMAKERS, A. J. M. *et al.* Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.23, p.883, 1991.

WAGENMAKERS, A. J. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v.26, p. 287, 1998.

WANNER, S. P. *et al.* Muscarinic cholinceptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. **Brain Research Bulletin**, v. 73, p. 28, 2007.

WANG, D. D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Progress in Neurobiology**, v.86, p.342, 2008.

WIECHETEK, M.; BREVES, G.; HOLLER, H. Effects of increased blood ammonia concentrations on the concentrations of some metabolites in rat tissues. **Experimental Physiology**, v.66, p.423, 1981.

WILKINSON, D. J.; NICHOLAS, J.; SMEETON, P. W. W. Ammonia metabolism, the brain and fatigue. **Progress in Neurobiology**, v.91, p.200, 2010.



WILLIAMSON, D. H.; LUND, I.; KREBS, H. A. The redox state of free nicotinamideadenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. **Biochemical Journal**, v.103, p.514, 1967.

YANG, D. *et al.* Integrative physiology of splanchnic glutamine and ammonium metabolism. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.278, p.469, 2000.

ZHAO, S. *et al.* Muscle adenine nucleotide metabolism during and in recovery from maximal exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v.88, p.1513, 2000.

ZWINGMANN, C. *et al.* Selective Increase of Brain Lactate Synthesis in Experimental Acute Liver Failure: Results of a [1H-13C] Nuclear Magnetic Resonance Study. **Hepatology**, v.37, 2003.

## ANEXO 1 – CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

## CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 236/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Ação central do Lactato no metabolismo de amônia durante o exercício**", que tem como responsável(is) **Nilo Resende Viana Lima**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **1/ 12/2010**.

Este certificado expira-se em **1/ 12/ 2015**.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 236/2010**, related to the project entitled "**Central action of lactate in the ammonia metabolism during the exercise**", under the supervisors of **Nilo Resende Viana Lima**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 1, 2010**.

This certificate expires in **December 1, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Dezembro de 2010.

**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)