

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA

**Efeito *in vitro* do hormônio peptídico Stanniocalcina-1 no metabolismo do  
tecido adiposo branco e do tecido adiposo marrom de ratos**

ALINE DA SILVA GONÇALVES COZER

Porto Alegre, 2016

Aline da Silva Gonçalves Cozer

Efeito *in vitro* do hormônio peptídico Stanniocalcina-1 no metabolismo do tecido adiposo branco e do tecido adiposo marrom de ratos

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutora em Fisiologia.*

*Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva*

Porto Alegre

2016

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir esta Tese gostaria de agradecer...

... à Prof. Roselis por toda a orientação e todo conhecimento transmitido;

... ao Prof. Luiz, por estar sempre presente e sempre disposto a ajudar ou contar uma boa história;

... à Prof. Márcia não tenho nem palavras para agradecer. Todas as conversas, ajudas e a orientação que me desses nesses quatro anos;

... ao Prof. Luciano e a Prof. Renata, por me ensinarem e estarem sempre a disposição para minhas dúvidas do western blot;

... aos demais professores do PPG Fisiologia, especialmente pra Prof. Maria Flávia por estarem sempre disponíveis para uma palavra, um auxílio;

... à Profa Fátima Guma por disponibilizar o ácido palmítico marcado para um dos experimentos da tese;

... aos colegas do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LAMEC/UFRGS), pelas risadas, encontros, ajudas, conversas, apoio constante;

... ao colega querido Tiago (Imprescindível) por estar sempre junto, nas horas boas e ruins. Sempre presente nos experimentos e sempre tentando me deixar tranquila;

.. à minha amiga, parceira, colega, irmã Claudinha, sem tua ajuda amiga, nada seria possível, talvez eu nem tivesse conseguido! Obrigada por tudo;

... à Claudinha (Chiarel), obrigada por sempre estar com os ouvidos prontos, nossas conversas vão ficar sempre na memória,

... aos meus pais Marcelo e Maria por nunca duvidarem do meu potencial, por estarem sempre presentes nesses 10 anos de vida acadêmica, pelos olhos brilhando a cada apresentação e por sempre afirmarem a minha vocação;

... à minha irmã Vanessa, sem tu não teria apresentações tão lindas. Obrigada por todo apoio e parceria;

... ao meu parceiro de vida Bruno, obrigada por acreditar quando as vezes nem eu acreditei. Obrigada pela ajuda, pelos almoços, pelos chás enquanto eu estudava. Obrigada por sempre tentar encontrar a solução para meus problemas e por todo teu amor. Nada seria igual sem a tua presença. Te amo;

... ao CNPQ pelo auxílio financeiro;

... à UFRGS pela minha formação desde a graduação em Biomedicina até o Doutorado.

## RESUMO

As Stanniocalcinas (STCs), também chamadas de hipocalcinas, são hormônios glicoproteicos identificados primeiramente em peixes teleósteos e possuem a função de diminuir os níveis plasmáticos de  $Ca^{+2}$ . Em mamíferos, esses hormônios estão expressos em uma variedade de tecidos. As STCs parecem ter, nesses organismos, uma função autócrina/parácrina ao contrário da ação endócrina clássica observada nos peixes. Estudos mostram a importância da STC-1 durante a adipogênese tanto no tecido adiposo branco (TAB) quanto no tecido adiposo marrom (TAM). Observou-se, dentre outras funções metabólicas, efeitos importantes desses hormônios aumentando o consumo de oxigênio mitocondrial e o tamanho das mitocôndrias.

Esse estudo teve como objetivo determinar a ação *in vitro* da STC-1, a partir da incubação do TAB e TAM de ratos com diferentes doses (0,386 pM; 3,86 pM e 38,6 pM) de STC-1 humana (hSTC-1) sobre o metabolismo intermediário desses tecidos. A hSTC-1 aumentou a incorporação de  $^{14}C$  glicose em lipídios no TAB, enquanto que no TAM a hSTC-1 diminuiu a síntese de lipídios. Além disso, a hSTC-1 aumentou a oxidação de  $^{14}C$  glicose no TAB, entretanto não alterou esse mesmo parâmetro no TAM. Os níveis de ATP foram maiores no TAM incubado com hSTC-1, porém a expressão proteica de UCP-1 e a oxidação de ácidos graxos foram semelhantes aquelas dos grupos controle. No TAB, a mobilização da reserva de triacilgliceróis não foi alterada pela presença da hSTC-1.

Nesse estudo concluímos que, a hSTC-1 tem uma ação tecido específica, interferindo no fluxo de glicose nos tecidos adiposos branco e marrom: aumentando as reservas energéticas no TAB e diminuindo a capacidade termogênica no TAM.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da localização do Corpúsculo de Stannius em peixes.....	18
Figura 2: Efeito da hSTC-1 na incorporação do $^{14}\text{C}$ da glicose em lipídios totais no tecido adiposo branco retroperitoneal.....	40
Figura 3: Efeito da hSTC-1 na incorporação do $^{14}\text{C}$ da glicose em $^{14}\text{CO}_2$ no tecido adiposo branco retroperitoneal.....	41
Figura 4: Efeito da hSTC-1 na razão ADP/ATP no tecido adiposo branco retroperitoneal.....	42
Figura 5: Liberação de glicerol no meio de incubação em resposta a diferentes combinações dos hormônios hSTC-1 e adrenalina no tecido adiposo branco retroperitoneal .....	43
Figura 6: Representação esquemática da oxidação de glicose e lipogênese mediada pela hSTC-1 no adipócito branco de ratos. ....	44
Figura 7: Efeito da hSTC-1 na incorporação do $^{14}\text{C}$ da glicose em lipídios totais no tecido adiposo marrom.....	58
Figura 8: Efeito da hSTC-1 na incorporação do $^{14}\text{C}$ da glicose em $^{14}\text{CO}_2$ no tecido adiposo marrom.....	59
Figura 9: Efeito da hSTC-1 na razão ADP/ATP e na concentração de ATP no tecido adiposo marrom.....	60
Figura 10: Efeito da hSTC-1 na expressão proteica da UCP-1 no tecido adiposo marrom.....	61
Figura 11: Representação esquemática das vias metabólicas influenciadas pela ação da hSTC-1 no tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos.....	73
Figura 12: Representação esquemática das vias metabólicas influenciadas pela ação da hSTC-1 no tecido adiposo marrom de ratos.....	74
Figura 13- Anexo: Efeito da hSTC-1 sobre a concentração de ATP no tecido adiposo branco de ratos.....	89

## TABELA

Tabela 1: Produtos da oxidação dos ácidos graxos. Incorporação do $^{14}\text{C}$ do ácido palmítico em $^{14}\text{CO}_2$ , produtos da $\beta$ oxidação solúveis em ácido e produtos do $^{14}\text{C}$ totais no tecido adiposo marrom incubado com diferentes doses de hSTC-1.....	62
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

1,25- (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: 1,25 diidroxicolecalciferol

AMPc: adenosina Monofosfato cíclico

ATP: Adenosina Trifosfato

CAL: Calcitonina

cDNA: DNA complementar

CS: Corpúsculo de Stannius

<sup>18</sup>F-FDG: <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose

G3P: Glicerol-3-fosfato

hSTC-1: Stanniocalcina 1 humana

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinase

PET- CT: Computed Tomographic (CT) and Positron-Emission Tomographic (PET)

PKA: Proteína Cinase A

PTH: Hormônio da paratireóide ou paratormônio

PTHrP: Peptídeo relacionado ao paratormônio

RNAm: Ácido Ribonucleico mensageiro

STC: Stanniocalcina

TAB: Tecido Adiposo Branco

TAG: triacilglicerol

TAM: Tecido Adiposo Marrom

UCP-1: Uncoupling protein-1

UCP-2: Uncoupling protein-2

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 Tecido Adiposo Branco e Tecido Adiposo Marrom.....	10
1.2 Tecido adiposo marrom e as proteínas desacopladoras de mitocôndrias (UCP-1) .....	14
1.3 Stanioalcinas (STCs).....	15
1.4 Funções Biológicas das STCs em mamíferos.....	20
1.5 STCs e sua influência no tecido adiposo .....	22
1.6 Evidências do papel das STCs sobre o metabolismo intermediário em mamíferos .....	23
2. OBJETIVO GERAL .....	25
2.1 Objetivos Específicos .....	25
2.1.1 Tecido adiposo branco .....	25
2.1.2 Tecido adiposo marrom.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Animais .....	26
3.2 Procedimentos Experimentais .....	26
3.3 Incorporação de <sup>14</sup> C glicose em <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> .....	27
3.4 Incorporação de <sup>14</sup> C glicose em <sup>14</sup> C lipídios totais.....	28
3.5 Determinação ADP/ATP e Concentração de ATP celular .....	28
3.6 Lipólise.....	29
3.7 Oxidação de ácidos graxos.....	29
3.8 Expressão da proteína UCP-1 .....	30
3.9 Análise Estatística .....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1 Artigo 1: Publicado na revista Lipids doi 10.1007/s11745-016-4202-5 em 11/10/2016.....	33
4.2 Artigo2: Submetido para revista Biochimie em 05/12/2016.....	47
5. DISCUSSÃO .....	67
6. CONCLUSÕES.....	73
6.1 Tecido adiposo branco .....	73
6.2 Tecido adiposo marrom.....	74
7. PERSPECTIVAS .....	76
8. REFERÊNCIAS .....	77
9. ANEXO.....	89

## 1. INTRODUÇÃO

O hormônio Stanniocalcina (STC) foi primeiramente identificado em peixes teleósteos onde é secretado pelo Corpúsculo de *Stannius* (WAGNER et al., 1986). As isoformas STC-1 e STC-2 foram identificadas em mamíferos mais tardiamente e ainda hoje não está estabelecida a estrutura de seus receptores e o seus mecanismos de transdução do sinal. Ao contrário do que acontece em peixes, onde é observada uma função endócrina clássica (WAGNER et al., 1989), em mamíferos, essa função parece ser principalmente autócrina e parácrina, uma vez que somente nos períodos de gestação e de lactação os níveis plasmáticos das STCs podem ser mensurados (DEOL et al., 2000).

Em peixes a STC tem papel fundamental no metabolismo do cálcio e do fosfato (WAGNER et al., 1992), principal hormônio hipocalcemiante, porém, em mamíferos as principais ações fisiológicas da STC-1 e da STC-2 ainda estão sendo elucidadas. Atualmente, muitos trabalhos têm investigado o papel das STCs como marcadores de diferentes tipos de câncer e pouco ainda se sabe sobre seus efeitos fisiológicos (CHANG et al., 2003, 2015; NA et al., 2015). Alguns estudos mostram uma ação tecido-específica das STCs sobre o metabolismo intermediário (FILVAROFF et al., 2002; MCCUDDEN et al., 2002; ELLARD et al., 2007; SCHEIN et al., 2015) e, para esclarecer a função metabólica desses peptídeos é importante que sejam identificadas suas ações em tecidos chave na homeostase energética de mamíferos, como são os tecidos adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM).

### 1.1 Tecido Adiposo Branco e Tecido Adiposo Marrom

Os tecidos adiposos branco (TAB) e marrom (TAM) possuem origem mesodérmica, porém os adipócitos desses tecidos se originam de linhagens de células tronco mesenquimais diferentes (GIRALT; VILLARROYA, 2013). O TAB é formado principalmente por adipócitos, que são circundados por tecido

conjuntivo ricamente vascularizado e inervado, e por macrófagos, fibroblastos e pré-adipócitos (AHIMA, 2006). Os adipócitos possuem uma única gota lipídica que preenche o citoplasma e, por isso, são conhecidos como uniloculares (SETHI; VIDAL-PUIG, 2007).

Há algumas décadas, acreditava-se que o tecido adiposo tinha participação passiva no metabolismo, produzindo e acumulando triacilgliceróis em situações de excesso de oferta energética (via lipogênica) e mobilizando as reservas energéticas (via lipolítica) para a obtenção de energia em situações de estresse ou escassez de alimentos, como por exemplo, durante o jejum (AHIMA, 2006; PROENÇA et al., 2014). Em condições fisiológicas, a homeostase do ciclo lipogênese/lipólise é regulada por diversos mecanismos endócrinos, neurais e nutricionais (POWER; SCHULKIN, 2008; PROENÇA et al., 2014). Contudo, além da função no balanço energético, o TAB é reconhecido atualmente como um órgão endócrino capaz de sintetizar e secretar uma série de peptídeos (adipocinas) que influenciam diretamente a homeostase metabólica. As adipocinas possuem inúmeras funções, como a regulação do metabolismo de carboidratos e de lipídios, do comportamento alimentar e da sensibilidade à insulina. Algumas patologias, como a obesidade e o *diabetes mellitus*, modificam o padrão de secreção de adipocinas (PROENÇA et al., 2014). Além desses peptídeos secretados, que possuem funções tanto endócrina quanto parácrina e autócrina, os adipócitos ainda possuem receptores para peptídeos e hormônios secretados em outros tecidos, como para hormônios esteroides sexuais e hormônios tireoidianos, por exemplo, os quais participam na regulação do metabolismo energético desse tecido (POWER; SCHULKIN, 2008; OBREGON, 2014).

Em mamíferos, o TAB não possui uma distribuição homogênea. Apesar de estar presente em uma camada subcutânea e também envolvendo órgãos como o coração e os rins, esse tecido se distribui em diversos locais com características endócrinas e metabólicas diferentes (PALOU et al., 2010; GIRALT; VILLARROYA, 2013; VILLARROYA et al., 2013). Os dois principais locais de depósito do TAB são nas regiões subcutânea e visceral (AHIMA, 2006; MAUVAIS-JARVIS et al., 2016). O dimorfismo sexual está presente na

distribuição dos depósitos de TAB: o acúmulo de adiposidade subcutânea é maior em fêmeas, enquanto os machos acumulam o TAB principalmente no abdômen (adiposidade visceral) (GROVE et al., 2010).

O tecido adiposo marrom (TAM) é um tecido que apareceu cedo na evolução dos mamíferos (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Os adipócitos marrons possuem uma alta concentração de mitocôndrias que dão sua coloração marrom característica, além de possuírem o depósito de triacilglicerol em inúmeras gotas citoplasmáticas (adipócitos multiloculares) (LICHTENBELT et al., 2009). O TAM é o principal responsável pela termogênese sem tremor (CANNON; NEDERGAARD, 2004; GIRALT; VILLARROYA, 2013) que utiliza como substrato os múltiplos estoques de lipídios localizados no citoplasma dos adipócitos marrons (LICHTENBELT et al., 2009). A produção de calor nesse tecido ocorre através do desacoplamento fisiológico da cadeia respiratória das mitocôndrias pela UCP-1 (*uncoupling protein 1* ou termogenina) onde a produção de ATP a partir da oxidação dos ácidos graxos é substituída pela produção de calor (CANNON; NEDERGAARD, 2004; GIRALT; VILLARROYA, 2013).

O principal depósito do TAM, em camundongos, localiza-se na região interescapular e também está presente em neonatos humanos, ao redor do pescoço e dos grandes vasos, sendo que sua proporção diminui em indivíduos adultos (VOSSSELMAN, MAARTEN J et al., 2013). Em adultos humanos, é importante salientar que os adipócitos marrons se agrupam em pequenas ilhas dentro do tecido adiposo branco, esses agrupamentos localizam-se no pescoço, mediastino (para-aórtico) e acima dos rins (suprarrenais). Porém, o principal grupo de adipócitos marrons é encontrado na região supraclavicular cervical (CYPESS et al., 2009). Não existe, em camundongos, depósito análogo a esse encontrado em humanos. (VOSSSELMAN, MAARTEN J et al., 2013). Em pequenos mamíferos adultos, o TAM está presente e possui importante papel na termogênese (LICHTENBELT et al., 2009).

A termogênese no TAM está primordialmente sob o controle do sistema nervoso simpático. Além disso, os hormônios tireoidianos atuam de forma sinérgica com a noradrenalina e são imprescindíveis para uma resposta termogênica completa (VOSSELMAN, MAARTEN J et al., 2013). A exposição ao frio, por exemplo, estimula a liberação de noradrenalina nos terminais simpáticos, aumentando a atividade termogênica do TAM (ARGYROPOULOS; HARPER, 2002). A noradrenalina ativa a cascata de sinalização AMPc/ PKA sinalizando o aumento da expressão de genes termorregulatórios e a estimulação da via lipolítica, através da fosforilação da lipase hormônio sensível (GIRALT; VILLARROYA, 2013). Assim como o estímulo simpático clássico, a dieta é um dos fatores analisados com poder de influenciar a capacidade termogênica do TAM. O aumento dos ácidos graxos livres no citoplasma, derivados de uma dieta rica em gorduras, aumenta a expressão de UCP-1 e a diferenciação dos adipócitos marrons, sugerindo termogênese induzida pela dieta (GIRALT; VILLARROYA, 2013).

Além da homeostase térmica, o TAM está envolvido com a homeostase metabólica, pois estudos mostram que em ambientes com temperatura neutra, ratos que não expressam UCP-1 desenvolvem obesidade (FELDMANN et al., 2009). A presença de atividade no TAM está negativamente relacionada com o índice de massa corporal e idade dos indivíduos, sendo que pessoas idosas e obesas possuem uma atividade menor desse tecido (CYPESS et al., 2009). O TAM também está envolvido com o *clearance* dos triglicerídeos plasmáticos e com a homeostase da glicose (BARTELT et al., 2011). Em camundongos expostos ao frio, o TAM exerce papel fundamental em diminuir os níveis pós-prandiais de triglicerídeos plasmáticos (BARTELT et al., 2011). Guerra e colaboradores (2001) utilizaram ratos com deficiência nos receptores de insulina no TAM e observaram que além da atrofia do tecido, ocorriam alterações na homeostase da glicose, como por exemplo, a diminuição do número total de células beta pancreáticas, hiperglicemia em jejum e resistência periférica à insulina (GUERRA et al., 2001). Em outro estudo, a perfusão de insulina em ratos, aumentou a captação de glicose no TAM a níveis semelhantes ao do músculo esquelético e níveis muito maiores do que no TAB.

Isso acontece porque a presença de GLUT4 é maior no TAM do que no TAB (VOSELMAN, MAARTEN J et al., 2013).

Em neonatos humanos o TAM ativo auxilia na manutenção da temperatura corporal (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Acreditava-se que, com o crescimento, esse tecido atrofiaria e teria pouca relevância na fisiologia do indivíduo adulto, uma vez que os adultos possuem atividade metabólica basal maior e massa muscular suficiente para a produção de calor por tremor (CYPESS et al., 2012). Entretanto, ao contrário do que se imaginava, Virtanen e colaboradores (2016), por meio de exames de PET-CT (utilizando como marcador a  $^{18}\text{F}$ -FDG), descreveram a atividade aumentada no TAM de pacientes adultos diagnosticados com feocrocitoma (tumor secretor de catecolaminas) (VIRTANEN, 2016). A partir desse estudo, os pesquisadores mapearam a localização e função do TAM em adultos saudáveis (LICHTENBELT et al., 2009). Estudos anatômicos comprovam a existência de depósitos de TAM em adultos humanos e a prevalência de atividade desse tecido varia de 2,5 a 45% (SETHI; VIDAL-PUIG, 2007; LICHTENBELT et al., 2009; VIRTANEN, 2016). O TAM não apresenta dimorfismo sexual quando analisamos sua distribuição, porém, as mulheres tem o TAM mais ativo do que os homens. Apesar da exposição ao frio ativar o TAM em humanos, a administração de efedrina (um simpatomimético) não foi responsável pelo aumento da termogênese nesse tecido (CYPESS et al., 2012). Desde a descoberta, em 2009, de que uma porcentagem grande de humanos adultos mantém o TAM ativo, estudos buscam encontrar formas de aumentar a atividade do TAM e, assim, diminuir os níveis de obesidade, resistência à insulina e hiperlipidemia (BARTELT et al., 2011; CYPESS et al., 2012; VOSELMAN, MAARTEN J et al., 2013).

## **1.2 Tecido adiposo marrom e as proteínas desacopladoras de mitocôndrias (UCP-1)**

Na maioria dos tecidos, a oxidação de substratos resulta na formação de ATP mitocondrial, através da cadeia transportadora de elétrons. A geração de ATP é possível pelo gradiente de prótons (eletroquímico) que se forma entre o

espaço intermembranas e a matriz mitocondrial (ARGYROPOULOS; HARPER, 2002; HIRABARA et al., 2007). Esse gradiente de prótons é utilizado pelo complexo  $F_0F_1$ ATPase para a síntese de ATP. Desta forma, a eficiência na síntese oxidativa de energia depende do grau de acoplamento entre a oxidação de substratos e a síntese de ATP. Há vários compostos capazes de aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial aos prótons, ou seja, diminuir a formação do gradiente eletroquímico e, desta forma, desacoplar a mitocôndria. Uma vez que o gradiente de prótons diminui, a força eletromotriz gerada pela passagem deles pela ATPase é menor e a produção de ATP cai (HIRABARA et al., 2007).

Em 1976, foi descoberta a primeira proteína desacopladora mitocondrial específica do tecido adiposo marrom, a proteína desacopladora-1 (UCP-1). Sua função está claramente relacionada com a termogênese em mamíferos humanos neonatos e adultos, hibernantes e roedores. A UCP-1 dissipa a força eletromotriz, pois permite uma rota alternativa para a entrada dos prótons para a matriz mitocondrial, desacoplando a mitocôndria e diminuindo a eficiência energética da célula. Com isso, há maior produção de calor, aumento na oxidação de substratos, no consumo de  $O_2$ , na produção de  $CO_2$  e na redução da produção de ATP (PORTER, 2006). Os ácidos graxos facilitam a condução dos prótons através da UCP-1, assim, eles atuam não só como substratos para a oxidação na mitocôndria, mas como um facilitador do desacoplamento mitocondrial (ARGYROPOULOS; HARPER, 2002). O estado funcional da UCP-1 depende da conformação da proteína. Os ácidos graxos levam a UCP-1 a um estado conformacional “relaxado” que permite o vazamento de prótons e dissipação do gradiente eletroquímico. Em contrapartida, o ATP, e outros nucleotídeos purínicos, mudam a estrutura do canal da UCP-1 impedindo o desacoplamento mitocondrial (BOUILLAUD et al., 2016).

### **1.3 Stanioalcinas (STCs)**

A homeostasia do cálcio é um processo biológico essencial à vida, pois este íon tem papel importante em diferentes mecanismos fisiológicos de

vertebrados. Ao longo da evolução, um intrincado sistema, composto por sensores e hormônios, foi desenvolvido para a manutenção da homeostasia do cálcio em vertebrados. Os níveis do íon cálcio são mantidos dentro de limites específicos, pois distúrbios nas concentrações intra e extracelulares afetam funções como a geração e a manutenção de potenciais de ação e os processos de divisão celular (BROWN, 2013). Em vertebrados terrestres, os níveis de cálcio plasmático são regulados, primariamente, por dois sistemas hormonais: calcitonina (CAL), representando o agente principal de um sistema hipocalcemiante e os hormônios hipercalcemiantes: o hormônio da paratireoide (PTH), a proteína relacionada ao hormônio da paratireoide (PTHrP) e a 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Esses hormônios atuam nos ossos influenciando as atividades dos osteoclastos e dos osteoblastos, nos rins e no intestino regulando a reabsorção e a absorção de cálcio por esses tecidos (BROWN, 2013). Estes hormônios foram amplamente estudados em humanos: a hipercalcemia estimula a síntese e a secreção de CAL que, por sua vez, promove a mineralização do osso; a PTH/PTHrP estimula a atividade osteoclástica no osso, promove a reabsorção de cálcio nos rins e a absorção no intestino via 1,25-(OH)-D<sub>3</sub>, aumentando a concentração plasmática de cálcio (GUERREIRO et al., 2001).

A proteína PTHrP foi descoberta em associação com certos tipos de câncer que causam elevações nos níveis de Ca<sup>+2</sup> plasmático (síndrome denominada *humoral hypercalcemia of malignancy*). A PTHrP é uma proteína multifuncional produzida em vários tecidos e atua de forma autócrina, parácrina e endócrina, exercendo efeito anabólico sobre o osso. Muitas funções já foram atribuídas a PTHrP (GUERREIRO et al., 2001). No entanto, já foram descritos outros membros dessa família de proteínas, o que levanta novas questões sobre as funções e os possíveis mecanismos de atuação dessas moléculas. Um exemplo é a descoberta da Stanniocalcina (STC) (AMEMIYA et al., 2002).

A STC, também chamada de hipocalcina ou teleocalcina, é um hormônio glicoproteico originalmente encontrado em peixes teleósteos e pode ser considerado o primeiro hormônio hipocalcêmico dos vertebrados (WAGNER et al., 1986, 1989). Nestes peixes é secretada pelo Corpúsculo de *Stannius* (CS)

(Figura 1), glândula endócrina que se localiza na superfície renal ventral dos peixes, regulando a homeostase cálcio/fosfato (WAGNER et al., 1986). A STC possui funções semelhantes à CAL (WAGNER et al., 1992) e protege os peixes de um episódio hipercalcêmico potencialmente tóxico. É importante salientar o contraste que existe na reserva de cálcio entre as diferentes classes de vertebrados. Enquanto os vertebrados superiores dependem do reservatório de cálcio encontrado nos ossos, os peixes dependem do cálcio presente no ambiente para regular os níveis plasmáticos desse íon (WAGNER et al., 1992). Desde o início da vida os riscos causados pelas flutuações nas concentrações de cálcio ambientais são frequentes para os peixes. Animais vivíparos têm seu desenvolvimento embrionário dentro do corpo materno que, por sua vez, possui as concentrações do íon cálcio em uma faixa homeostática restrita. Entretanto, desde a fase embrionária os peixes têm que controlar a captação de cálcio do meio externo, pois nos diferentes ambientes as concentrações do íon cálcio apresentam variações que podem chegar a 1000 vezes (LU et al., 1994). Este hormônio restabelece a normocalcemia por meio de três efeitos regulatórios principais: 1) inibindo a absorção de cálcio através do epitélio intestinal; 2) inibindo a captação de cálcio ambiental pelas brânquias e 3) estimulando a reabsorção renal de fosfato, que tem a função de quelar o  $\text{Ca}^{+2}$  em excesso (WAGNER et al., 1986; LU et al., 1994; VARGHESE et al., 2002; YEUNG et al., 2012). A causa primária de estimulação da secreção da STC pelo CS é o aumento do cálcio extracelular acima dos níveis fisiológicos. Além do aumento de secreção hormonal ainda há o aumento dos níveis de RNAm da STC (WAGNER; JAWORSKI, 1994). Os peixes possuem receptores sensíveis ao cálcio que desencadeiam os sinais para a resposta fisiológica às flutuações nas concentrações desse íon (RADMAN et al., 2002). Estudos recentes propõem que as STCs também teriam um papel regulador sobre a concentração de outros íons além do  $\text{Ca}^{+2}$ , como o  $\text{Na}^{+}$  e o  $\text{Cl}^{-}$  (YEUNG et al., 2012).

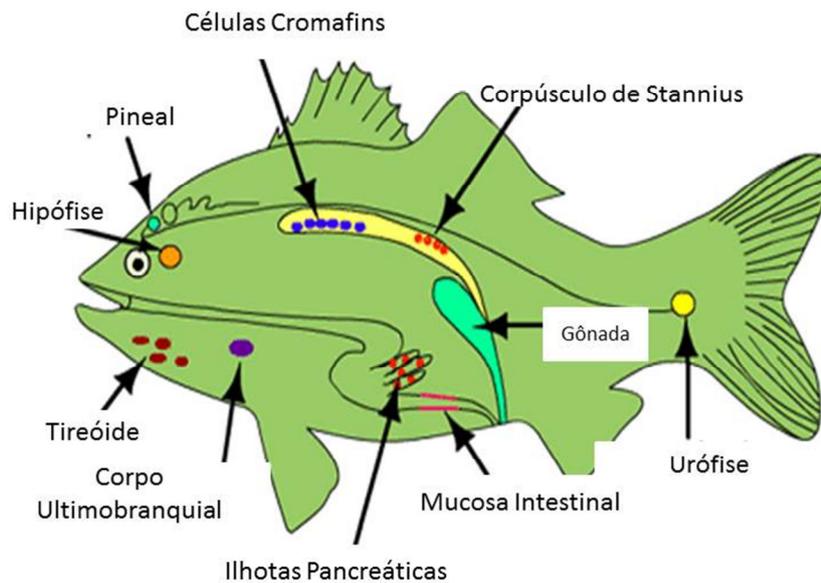


Figura 1. Representação da localização do CS em peixes (SERLACHIUS et al., 2004). Adaptado de [www.vet.ohio-state.edu](http://www.vet.ohio-state.edu)

Nos mamíferos não se conhece nenhuma estrutura que possa ser comparada ao CS, desta forma, acreditava-se que a presença e a função da STC tivessem se perdido durante a evolução. Um estudo imunocitoquímico, utilizando anticorpos de STC de salmão, encontrou no rim humano proteínas semelhantes à STC (WAGNER et al., 1995). Como nos peixes o CS é originado embriologicamente dos néfrons, o tecido renal foi o ponto de partida para a busca de genes ortólogos à STC em humanos (WAGNER et al., 1995; VARGHESE et al., 2002). No mesmo ano foram clonados o cDNA de STC com alta homologia com o hormônio dos peixes (CHANG et al., 1995; OLSEN et al., 1996). Enquanto nos peixes essa proteína é sintetizada em um órgão específico, em tecidos humanos, diversos estudos constataram que a STC apresenta uma distribuição ubíqua entre os tecidos, sendo o RNAm desse peptídeo expresso nos ovários, nos rins, no pulmão, no fígado, na próstata, no coração, na tireóide, no músculo e nos tecidos adiposos branco e marrom (CHANG et al., 1995; RADMAN et al., 2002; SERLACHIUS; ANDERSSON,

2004; SERLACHIUS et al., 2004). Entretanto, o nível de STC nesses órgãos é cerca de 100 vezes menor do que no CS. A comprovação da existência do cDNA de STC em diferentes tecidos de camundongos (CHANG et al., 1996) demonstrou que a STC teria um papel parácrino/autócrino ao contrário daquela função endócrina clássica encontrada nos peixes. Baseado no padrão de expressão da STC humana sugere-se que ela atue como um mediador local. Algumas funções dos peixes parecem ser mantidas em humanos, como por exemplo, o papel sobre o metabolismo mineral com as funções de transporte iônico nos rins e no intestino. Além disso, quando o hormônio humano é administrado em peixes há manutenção da funcionalidade indicando que os domínios dos receptores são bem conservados evolutivamente (CHANG; REDDEL, 1998; NIU et al., 1998; VARGHESE et al., 2002).

McCudden e colaboradores (2001) realizaram um estudo para investigar se, além do papel endócrino clássico encontrado em peixes, a STC atuava de forma autócrina/parácrina como em mamíferos.. A surpresa foi que, também em peixes, a STC-1 era expressa em diversos tecidos como gônadas, coração, músculo e intestino. Contudo, esses achados sugerem que, além da função já bem estabelecida de controle dos níveis de cálcio, a STC também tenha, em peixes, funções locais, como, provavelmente, ocorre com a STC humana (MCCUDDEN et al., 2001).

A identificação das células-alvo da STC ainda é difícil pela falta de informações a respeito do receptor. Propõe-se que o sistema de sinalização do receptor de STC seja acoplado a proteína G, pois uma ativação da via AMPc /PKA foi constatada em células do túbulo proximal renal tratadas com STC (LU et al., 1994; YEUNG et al., 2012). Recentemente, em *Anguilla japonica*, Gu e colaboradores (2015) demonstraram a presença de sítios de ligação à STC 1 em membrana plasmática, mitocondrial e nuclear de células de brânquias em cultura. Os autores mostraram que a STC-1 exerce sua ação inibitória pela via do AMPc, reduzindo os níveis intracelulares de cálcio (GU J, 2015).

Na maioria dos peixes e em todos os mamíferos, a STC-1 é uma proteína glicosilada homodimérica com aproximadamente 50 kD. Ela é sintetizada como

um pré-pró-hormônio, em que a sequência madura tem em média 250 aminoácidos (WAGNER et al., 1992; OLSEN et al., 1996; VARGHESE et al., 2002; CHANG et al., 2003).

Dois anos após a clonagem do cDNA da STC humana, diferentes grupos de pesquisa encontraram a partir de pesquisas *“in silico”* utilizando o programa BLASTn do NCBI (National Center for Biotechnology Information), uma proteína que chamaram primeiramente de proteína relacionada a STC. Posteriormente, a STC de peixes e a primeira STC humana clonada foram denominadas de STC-1 e a segunda proteína homologa às duas primeiras foi chamada de STC-2. Uma análise da expressão da proteína da STC-2 em diversos tecidos de humanos e camundongos mostrou o mesmo padrão de expressão variado da STC-1 (CHANG; REDDEL, 1998; DIMATTIA et al., 1998; LUO et al., 2016). Apesar da STC-2 mostrar apenas 30% de identidade na sequência de aminoácidos da STC-1 humana, os limites entre íntrons e éxons, os resíduos de cisteína e os sítios de glicosilação das moléculas permaneceram conservados entre essas duas proteínas. Estudos sobre a estrutura genômica e a filogenia dessas proteínas mostram que elas podem ser derivadas de um gene ancestral comum. Em 2005, Luo e colaboradores (2005) também clonaram a STC-2 de peixes. O RNAm da STC-2 de peixes e de mamíferos, assim como a STC-1, também é expresso em diversos tecidos de peixes (DIMATTIA et al., 1998). Em mamíferos, tecidos como o pâncreas, o baço, os rins e o músculo esquelético possuem uma marcante expressão do RNAm da STC-2.

#### **1.4 Funções Biológicas das STCs em mamíferos**

Os primeiros estudos que investigaram a funcionalidade dos hormônios STC-1 e STC-2 em mamíferos utilizaram ratos transgênicos que super expressavam ou eram *knockout* para os genes das STCs. Todos os animais que super expressavam os genes das STCs tinham seu crescimento e desenvolvimento muscular e ósseo prejudicados. Os animais *knockout* para STC-1 não mostram alterações no fenótipo e aqueles que não expressavam a proteína STC-2 mantinham os efeitos inibitórios do crescimento vistos na super

expressão dessa molécula (FILVAROFF et al., 2002; VARGHESE et al., 2002; CHANG et al., 2005, 2008; GAGLIARDI et al., 2005).

Além de efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento dos organismos ainda existem evidências da importância das STC-1 na regulação da homeostase do cálcio e do fosfato em mamíferos (OLSEN et al., 1996; ZHANG et al., 2000). Zhang e colaboradores (2000) constataram que a STC-1 aumenta a captação celular de fosfato inorgânico em culturas de neurônios. Esses autores também demonstraram que a STC-1 diminuiu o dano neuronal causado pelo influxo de cálcio que medeia a toxicidade durante um processo isquêmico em ratos. A idéia de uma relação funcional entre a STC-1 e a regulação intracelular de cálcio é fortalecida pela ação inibitória desse hormônio na movimentação transmembrana deste íon, via canais de cálcio do tipo lento nos cardiomiócitos (YEUNG et al., 2012). Estudos com animais mostraram o envolvimento da STC-1 com a homeostase hídrica nos rins (TURNER et al., 2010, 2011). Todos esses dados sugerem o papel importante da STC-1 na homeostase do cálcio e no equilíbrio osmótico em mamíferos. Em contraste, pouco se sabe acerca do papel da STC-2 no controle dos níveis de cálcio e do fosfato plasmáticos em mamíferos. Alguns autores postulam que talvez os dois hormônios tenham funções biológicas complementares (ISHIBASHI et al., 1998). A STC-1 possui ainda funções sobre implantação e desenvolvimento do embrião, além de participar da produção de hormônios esteróides nas células tecais de ovários de camundongos (VARGHESE et al., 1998).

Apesar de muitas funções, principalmente do hormônio STC-1, já terem sido relatadas, atualmente os tópicos de maior estudo têm sido o envolvimento desses hormônios nos processos inflamatórios e carcinogênicos (CHANG et al., 2003, 2015; NA et al., 2015). Chang e colaboradores (2003) mostraram que os níveis de expressão da STC-1 e STC-2 estão elevados na maioria dos tipos de câncer humano. Em 2015, esse mesmo grupo de pesquisadores publicou dados que relacionam a expressão de STC-1 com o crescimento tumoral e metástase no câncer de mama (CHANG et al., 2015). Esses dois hormônios também têm sido relacionados aos processos de angiogênese, de proliferação

celular e de apoptose. A STC-2 foi relacionada com o aumento de invasão endotelial em tumores (YEUNG et al., 2012). Além disso, a STC-2 já foi identificada como potencial marcador tumoral para o câncer de pulmão (NA et al., 2015). Essas funções sobre o crescimento relacionadas às STCs humanas podem ter ligação com os efeitos tanto pró quanto anti-apoptótico dessas proteínas. Estudos demonstraram que a STC-1 possui ambos os efeitos (ZHANG et al., 2000; WU et al., 2006).

### **1.5 STCs e sua influência no tecido adiposo**

Em células do corpo lúteo ovariano, o hormônio STC-1 foi encontrado em níveis baixos em mitocôndrias. Contudo, a maior parte da STC estava localizada no citoplasma associada às perilipinas nas gotas lipídicas (PACIGA et al., 2003). Foram encontrados receptores de STC tanto nas gotas lipídicas quanto na membrana plasmática, utilizando a mesma técnica que McCudden e colaboradores (2002) quando encontraram os possíveis sítios de ligação da STC no fígado e nos rins. Nas células esteroideogênicas, a STC parece ter influência na produção de progesterona por estar associada às gotas lipídicas e possivelmente, impedir o acesso da lipase hormônio sensível aos lipídios armazenados nessas células, diminuindo a produção de progesterona. Esses receptores, encontrados associados à gota lipídica, têm uma afinidade dez vezes maior do que aqueles encontrados associados à membrana plasmática (PACIGA et al., 2003). A STC foi encontrada também nas membranas plasmáticas e gotas lipídicas, associadas às perilipinas, nas células adrenocorticais e adipócitos brancos e marrons, sugerindo que esse peptídeo seja um possível modulador do metabolismo de lipídios (SERLACHIUS; ANDERSSON, 2004; PACIGA et al., 2005). Serlachius e colaboradores (2004) encontraram alta expressão de STC-1 nas fases finais de diferenciação dos adipócitos brancos (adipogênese) e nos adipócitos maduros.

## 1.6 Evidências do papel das STCs sobre o metabolismo intermediário em mamíferos

Poucos trabalhos na literatura consultada demonstram o papel da STC-1 e da STC-2 no controle do metabolismo intermediário. Camundongos transgênicos que super expressavam STC-1 no músculo esquelético apresentaram mudanças metabólicas importantes. Esses animais apresentaram hiperfagia, perda de peso e maior consumo de oxigênio. Além disso, houve um aumento na rapidez de depuração da glicose (FILVAROFF et al., 2002). A STC-1 é responsável também por um aumento no tamanho das mitocôndrias sem prejudicar a integridade dessas organelas (AMEMIYA et al., 2002; FILVAROFF et al., 2002; MCCUDDEN et al., 2002; ELLARD et al., 2007).

McCudden e colaboradores (2002) investigaram a ligação da STC-1 ao receptor em membranas de hepatócitos e de células renais. Eles demonstraram a ligação do hormônio STC-1 na membrana plasmática e na membrana mitocondrial de hepatócitos, sendo que 90% do hormônio estava localizado na matriz mitocondrial destas células. Esses achados sustentam a importância deste polipeptídeo no controle do metabolismo mitocondrial, sendo que é a primeira vez que receptores de hormônios peptídicos são verificados na membrana dessa organela celular. Apesar de todas as evidências, até hoje, nenhum trabalho identificou experimentalmente o receptor de STC-1 em mamíferos.

Em 2002, McCudden e colaboradores observaram, *in situ*, ligação de alta afinidade de STC-1-AP (ligada à fosfatase alcalina) na superfície celular de tecidos como rim e fígado. Os autores purificaram mitocôndrias desses dois tecidos e constataram que nesta organela também ocorria uma ligação de alta afinidade de STC-1-AP, mais especificamente na membrana interna da mitocôndria e verificaram que essa ligação estimulava o metabolismo mitocondrial e a transferência de elétrons (MCCUDDEN et al., 2002). Ellard e colaboradores (2007) demonstraram que a ligação STC-1 aos receptores na

mitocôndria pode ser desfeita pela adição de ATP. A exposição de frações mitocondriais de hepatócitos e de células musculares à STC-1 aumentou o consumo de oxigênio e a concentração de cálcio mitocondrial e diminuiu a razão ADP:O<sub>2</sub>, o que indica uma produção menos eficiente de ATP. Além disso, a STC-1 aumentou a respiração celular de hepatócitos e de células musculares (ELLARD et al., 2007). O aumento no consumo de oxigênio, em conjunto com uma redução dos níveis de ATP, mostra o papel da STC-1 na fosforilação oxidativa (MCCUDDEN et al., 2002; ELLARD et al., 2007). Esses trabalhos contribuem para a melhor compreensão do papel metabólico da STC-1. Em macrófagos, a STC-1 aumentou a expressão de UCP-2 diminuindo, desta forma, os níveis intracelulares de ATP (WANG et al., 2009).

Recentemente, foi demonstrado o papel da STC-1 na gliconeogênese renal (SCHEIN et al., 2015). A incorporação de <sup>14</sup>C glutamina em <sup>14</sup>C glicose foi menor, bem como a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK), em resposta à ação da STC-1 na medula renal de ratos. Em peixes essa resposta é diferente e a STC-1-A foi responsável pelo aumento da incorporação de <sup>14</sup>C glutamina em <sup>14</sup>C glicose enquanto reduz a gliconeogênese a partir do <sup>14</sup>C lactato. Esses resultados de Schein e colaboradores (2015) identificam uma função importante da STC no metabolismo intermediário de ratos e de peixes, sugerindo uma conservação de função nos vertebrados.

A partir desses estudos, observamos que a STC-1 possui uma ação tecido-específica, pois altera diversas vias do metabolismo energético em tecidos/ células diferentes. A presença de sítios de ligação para a STC-1 nas gotas lipídicas de diversas células produtoras de esteroides e adipócitos brancos pode ter como consequência uma atuação direta da STC-1 no ciclo síntese/mobilização de lipídios. Além disso, existe a possibilidade de que no TAM, tecido rico em mitocôndrias, de que a STC-1 seria capaz de regular o metabolismo de lipídios participando da regulação da produção de ATP e da termogênese.

## 2. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi de investigar o efeito de diferentes doses (0,386 pM; 3,86 pM e 38,6 pM) do hormônio STC-1 humana (hSTC-1) sobre o metabolismo intermediário dos tecidos adiposos branco e marrom de *Rattus norvegicus* com o propósito de demonstrar o efeito metabólico desses hormônios.

### 2.1 Objetivos Específicos

2.1.1 Determinar no tecido adiposo branco de *Rattus norvegicus* os efeitos de diferentes doses das hSTC-1 humana sobre a:

- a) Oxidação de  $^{14}\text{C}$  glicose;
- b) Síntese de  $^{14}\text{C}$  lipídios totais;
- c) Razão ADP/ATP celular;
- d) Concentração de ATP intracelular;
- e) Lipólise.

2.1.2 Determinar no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* os efeitos de diferentes doses das hSTC-1 humanas sobre a:

- a) Oxidação de  $^{14}\text{C}$  glicose;
- b) Síntese de  $^{14}\text{C}$  lipídios totais;
- c) Razão ADP/ATP celular;
- d) Concentração de ATP intracelular;
- e) Oxidação de 1- $^{14}\text{C}$ - ácido palmítico;
- f) Expressão proteica da UCP-1.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados um total de 96 ratos machos (*Rattus norvegicus*), pesando aproximadamente  $300 \pm 50$  g provenientes do CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais em Laboratório) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O cálculo do “n” (número mínimo de animais), foi baseado na análise da atividade lipolítica com a administração de metilxantinas, no Computer Programs for Epidemiologists (WIN PEPI – versão 9.1), utilizando-se dados de estudo prévio (STICH et al., 1997).

Os animais foram mantidos em temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas e com água e ração *ad libitum*. A alimentação foi mantida até o momento do experimento.

Os procedimentos experimentais aos quais os animais foram submetidos obedeceram às normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS (nº 23583).

#### 3.2 Procedimentos Experimentais

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina no início da manhã. O tecido adiposo branco retroperitoneal e o tecido adiposo marrom interescapular foram retirados rapidamente e fatiados em uma placa de Petri sobre gelo em tampão Krebs-Hanseleit Bicarbonato (KRB) gelado (118 mM de NaCl, 4,8 mM KCl, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> e 24,8 mM NaHCO<sub>3</sub>), pH 7,4. Para os experimentos, os tecidos, provenientes de um mesmo animal, eram divididos para o grupo controle (sem hormônio) e para as diferentes doses de STC-1 (Recombinant Human STC 1, HEK 293 cell line, RayBiotech Inc. USA) que variaram de 0,386 pM a 38,6 pM, conforme o protocolo executado. Todas as doses estão dentro dos níveis

fisiológicos. (NIU, DE et al., 2000; SAZONOVA et al., 2008; SCHEIN et al., 2015).

Em todos os experimentos, foi realizada uma pré-incubação dos tecidos em 1mL de KRB pH 7,4 durante 15 minutos a 37°C, sob agitação constante, em banho metabólico tipo *Dubnoff*. Os tubos foram aerados com gás carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5%, v/v) durante 30 segundos para a substituição da fase gasosa.

### 3.3 Incorporação de <sup>14</sup>C glicose em <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

Aproximadamente 300 mg de tecido adiposo branco e 100 mg de tecido adiposo marrom foram colocados em frascos com tampa de borracha contendo 1 mL de KRB 1% BSA pH 7,4, acrescido de 0,15μCi de <sup>14</sup>Ci de [U-<sup>14</sup>C]-glicose (55 mCi/mmol GE-Healthcare) e 5mM glicose na ausência de STC-1 (grupo controle) ou na presença do hormônio nas doses de 0,386 pM e 3,86 pM. As tampas de borracha foram acopladas a vidros em formato de “J” com um poço onde foi colocado papel 3MM para a captação do <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> resultante da oxidação da <sup>14</sup>C-glicose. Os tecidos foram aerados com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5% v/v) por 30 segundos e as tampas, posteriormente, fechadas e vedadas com *Parafilm*. Os tecidos foram incubados durante 60 minutos, a 37°C sob agitação constante em banho metabólico. A reação de oxidação foi interrompida injetando-se nos poços 0,25 mL de NaOH 2M e 0,25 mL de TCA 50% no meio de incubação, através da tampa de borracha. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24 horas para a captação do <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> formado (TORRES et al., 2001). Após este período, foram retirados os vidros em formato de “J” e colocados em frascos de contagem com 10 ml do líquido de cintilação [Tolueno - Triton X100 (2:1) – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] e levados a um contador LKB-Wallac, para determinar a formação do <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Os resultados foram expressos em nmoles de <sup>14</sup>C glicose incorporados em <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> por mg de tecido por hora.

### 3.4 Incorporação de $^{14}\text{C}$ glicose em $^{14}\text{C}$ lipídios totais

Aproximadamente 300 mg de tecido adiposo branco e 100 mg de tecido adiposo marrom foram incubados em banho metabólico pH 7,4 (*Dubnoff*) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, sob agitação constante em 1 mL de KRB 1% BSA contendo  $0,15\ \mu\text{Ci}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose ( $55\ \text{mCi/mmol}$  GE-Healthcare) e  $5\ \text{mM}$  de glicose em ausência (grupo controle) ou presença de STC-1 nas concentrações de  $0,386\ \text{pM}$  e  $3,86\ \text{pM}$ . Após o tempo de incubação as reações metabólicas foram interrompidas em gelo. Os tecidos foram lavados em KRB gelado, secos em papel de filtro e homogeneizados em uma solução de clorofórmio:metanol (2:1; v/v). Os  $^{14}\text{C}$ -lipídios foram extraídos segundo método descrito por Folch et al. (1957). Após a evaporação do clorofórmio os  $^{14}\text{C}$ -lipídios foram dissolvidos em 5 mL de Tolueno- PPO 0,4% e a radioatividade contada em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac. Os resultados foram expressos como  $\text{mmoles de }^{14}\text{C}\text{-glicose incorporados em }^{14}\text{C}\text{-lipídios totais. g de tecido}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  de incubação (FOLCH et al., 1957).

### 3.5 Determinação ADP/ATP e Concentração de ATP celular

Aproximadamente 300 mg de tecido adiposo branco e 100 mg de tecido adiposo marrom foram colocados em tubos com KRB 1% BSA na ausência (grupo controle) ou presença de STC-1 ( $0,386\ \text{pM}$  e  $3,86\ \text{pM}$ ) e foram incubados em banho metabólico do tipo *Dubnoff* a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Após o tempo de incubação os tubos foram imediatamente colocados em gelo e os tecidos foram, então, homogeneizados com *Omni Mixer* em tampão de lise ( $\text{NaF } 20\ \text{mM}$ , gelatina  $0,4\ \text{g/L}$ , TCA 6% e solução fisiológica). As amostras foram centrifugadas a  $9.500\ \text{rpm}$  durante 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante teve seu pH neutralizado ( $\text{pH} = 7$ ) com uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3\ 2\text{M}$ . Esse sobrenadante neutralizado foi utilizado para a determinação da razão ADP/ATP conforme o Kit comercial (Biovision ApoSENSOR™ ADP/ATP Ratio Assay Kit). A determinação da relação ADP/ATP foi realizada logo após o experimento. A partir de uma curva

padrão de ATP foram determinados os valores da concentração de ATP celular. Esses valores foram expressos em nmol de ATP/ mg de tecido

### 3.6 Lipólise

Aproximadamente 300 mg de tecido adiposo branco foram colocados em tubos com KRB 1% BSA livre de ácidos graxos na ausência (grupo controle) ou na presença de STC-1 (0,386 pM) e foram incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff a 37°C por 1 hora. A lipólise foi estimulada com adição de 20 µL de uma solução de adrenalina ( $25 \times 10^{-4} \text{M}$ ) com ácido ascórbico (17.6 mg/mL). As fatias de TAB foram divididas em cinco grupos: (1) controle (sem a presença de STC e adrenalina), mas com 20 µL de ácido ascórbico. O grupo controle foi incubado por 120 min; (2) STC-1 0.386 pM, incubado por 60 min; (3) adrenalina incubada por 60 min; (4) STC-1 0,386 pM incubado por 60 min seguido por adrenalina incubados por mais 60 min; (5) adrenalina (incubado por 60 min) seguido de STC-1 0,386 pM, incubados por mais 60 min. A concentração do glicerol liberado no meio de foi determinado por meio de kit comercial (R-Biopharm<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany). Valores foram expressos como mg de glicerol por 100 mg de tecido.

### 3.7 Oxidação de ácidos graxos

Aproximadamente 100 mg de TAM foram colocados em tubos com tampão PBS (pH 7,4), 0,05 M de ácido palmítico frio, 11,5 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 0,1 µCi  $1\text{-}^{14}\text{C}$  ácido palmítico, na presença de STC-1 (0,386 pM e 3,86 pM) e foram incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff a 37°C por 1 hora. Os controles foram incubados sob as mesmas condições, porém sem a presença do hormônio. As tampas de borracha foram acopladas a vidros em formato de “J” com um poço onde foi colocado papel 3MM para a captação do  $^{14}\text{CO}_2$  resultante da oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose. Os tecidos foram aerados com carbogênio ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ , 95:5% v/v) por 30 segundos e as tampas, posteriormente, fechadas e vedadas com *Parafilm*. A reação foi parada com a adição de 400 µL de ácido cítrico (2M) gelado (pH 1,5). A captura do  $^{14}\text{CO}_2$  foi feita por uma hora

com os tubos constantemente sobre o gelo. Após este período, foram retirados os vidros em formato de “J” e colocados em frascos de contagem com 10 ml do líquido de cintilação [Tolueno - Triton X100 (2:1) – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] e levados a um contador LKB-Wallac, para determinar a formação do  $^{14}\text{CO}_2$ . Ao meio de incubação foram então adicionados 6  $\mu\text{mol}$  de ácido palmítico frio dissolvidos em 100  $\mu\text{L}$  de etanol e 0.6 mL de ácido perclórico (6M). Após 60 min os tubos foram centrifugados a 3000 g por 20 min a 4 °C, e o sobrenadante foi filtrado (papel Whatman 2V). Os produtos da  $\beta$  oxidação solúveis em ácidos foram então determinados adicionando o filtrado ao líquido de cintilação. Os resultados foram expressos como  $\text{mmol } ^{14}\text{C} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

### 3.8 Expressão da proteína UCP-1

A pré-incubação e a incubação do TAM foram realizadas conforme descrito no item 3.2. Após a incubação, os tecidos foram imediatamente congelados em gelo seco e estocados a  $-80^\circ\text{C}$  até sua análise. O TAM foi homogeneizado em tampão de lise (20 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glicerol, 1% Triton-X), pH 8.0, contendo 1  $\mu\text{M}$  PMSF, 10mM de NaF, 1% de coquetel de inibidores de fosfatases (Sigma – P0044) e 1% de coquetel de inibidores de protease (Sigma – P8340). A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Quarenta  $\mu\text{g}$  de proteína das amostras foram separadas por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio - Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Hybond–ECL, GE Healthcare; São Paulo, Brasil) usando um sistema de transferência por eletroforese (Bio-Rad; Hercules, CA). As membranas foram incubadas *overnight* a  $4^\circ\text{C}$  com um anticorpo primário anti-UCP-1 (1:3000; Abcam - ab10983 33KDa) desenvolvido em coelho e processadas para imunodeteção usando um anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:10000; Millipore). As bandas contendo a proteína de interesse foram detectadas com sistema de quimioluminescência (ECL; Merck Millipore), seguida por exposição a um filme de autorradiografia (Amersham). As

autorradiografias foram digitalizadas e a intensidade das bandas foi quantificada por densitometria usando o software Image J 1.50 (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A  $\beta$ -actina (1:15000; Santa Cruz- sc-47778 54kDa) foi utilizada como controle de carga. Os dados foram expressos de forma relativa, em relação ao grupo controle.

### **3.9 Análise Estatística**

Os resultados foram comparados utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA), complementado por um pós teste de Student–Newman-Keuls (SNK). Foi analisada a normalidade de todos os resultados (Kolmogorof-Smirnov test) e homogeneidade (Levene test) dos dados. Os resultados foram considerados significantes quando o  $P < 0,05$  (Software GraphPad Prism 5).

## 4. RESULTADOS

Os resultados da presente Tese serão apresentados em formato de artigos, de acordo com os experimentos descritos no item 3 Material e Métodos. O artigo 1 já está publicado e o artigo 2 está submetido.

4.1 Artigo 1: Aline G. Cozer; Márcia Trapp; Claudia Vieira Marques; Tiago L. Martins; Jorge Felipe A. Model; Vanessa Schein; Luiz Carlos Kucharski; Roselis S. M. Da Silva. Stanniocalcin 1 Enhances Carbon Flux from Glucose to Lipids in White Retroperitoneal Adipose Tissue in the Fed Rat. **Lipids**. doi 10.1007/s11745-016-4202-5, publicado em 11/10/2016.

4.2 Artigo 2: Aline G. Cozer; Márcia Trapp; Tiago L. Martins; Luciano S. De Fraga; Claudia Vieira Marques; Jorge Felipe A. Model; Vanessa Schein; Luiz Carlos Kucharski; Roselis Silveira Martins Da Silva. Effects of Stanniocalcin-1 on rat brown adipose tissue glucose flux. **Biochimie** (05/12/2016)

**4.1 Artigo 1: Publicado na revista Lipids doi 10.1007/s11745-016-4202-5 em 11/10/2016**

Stanniocalcin 1 enhances carbon flux from glucose to lipids in white retroperitoneal adipose tissue in the fed rat

Aline G. Cozer \*; Márcia Trapp; Claudia Vieira Marques; Tiago L. Martins; Jorge Felipe A. Model; Vanessa Schein; Luiz Carlos Kucharski; Roselis S. M. Da Silva

Post-Graduate Program in Biological Science: Physiology, Department of Physiology, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Abstract**

The present work assesses *in vitro* the role of human Stanniocalcin 1 (hSTC-1) in glucose metabolism in white retroperitoneal adipose tissue (WRAT) from fed rat. In the fed state, hSTC1 increases the incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into lipids in the rat WRAT. The increase in lipogenesis capacity supports the hypothesis that the activity of the glycerol-3-phosphate-generating pathway (glycolysis) from glucose is regulated by hSTC-1. The effect of hSTC-1 on *de novo* fatty acid synthesis and on glucose oxidation in WRAT is supported by an 85% increase in <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from <sup>14</sup>C-glucose. The incubation of WRAT in the presence of hSTC-1 maintained the ADP/ATP ratio close to the control group. The presence of hSTC-1 in incubation medium did not inhibit the lipolytic effect of epinephrine. In conclusion, hSTC-1 is one of the hormonal factors that control glucose metabolism in WRAT in the fed state.

**Keywords**

Lipid metabolism, endocrinology

**Abbreviations**

G3P – Glycerol 3 Phosphate

hSTC-1 – Human Stanniocalcin 1

KH - Krebs Henseleit

NADPH - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

TAG – triacylglycerols

WAT - White Adipose Tissue

WRAT – White Retroperitoneal Adipose Tissue

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. RSMS and LCK are PQ-CNPq fellows, and AGC and JFAM are CNPq fellows, and VS is PNPd-CAPES fellow. The experiments were performed according to the current Brazilian laws.

### **Conflict of interest**

We declare no conflict of interest.

\*Corresponding author:

Msc. Aline G Cozer

Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500

90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

e-mail: [alinecozer15@gmail.com](mailto:alinecozer15@gmail.com)

## 1. Introduction

White retroperitoneal adipose tissue (WRAT) contains the largest concentration of metabolic energy in the body, and this reserve depends on the balance of lipogenesis and lipolysis, two opposing processes that are tightly controlled by hormonal and nutritional factors [1, 2].

Stanniocalcin (STC) is a mammalian autocrine/paracrine factor that was first isolated in fish where it regulated calcium/phosphate homeostasis [3,4, 5]. The STC family of hormones, comprising STC-1 and STC-2, are widely expressed in mammalian tissues, but little is known about the effects of STCs on lipid metabolism. Serlachius et al. [6] reported high STC-1 expression in mature white and brown human adipocytes. Negligible amounts of STC-1 were found in untreated 3T3-L1 cells (pre-adipocyte cell line), whereas 3T3-L1 cells treated with an adipogenic cocktail, up-regulated the expression of STC-1 concomitantly with acquisition of the adipocytic phenotype [7]. In adrenal glands, receptors for STC isoforms were found on the plasma membrane and lipid droplet membrane, suggesting a role in fat storage and/or release independent of its effects on steroid hormone synthesis [8]. Data suggest that STC-1 is produced and secreted by mature adipocytes and support the hypothesis of a role for STC-1 in lipid metabolism in WAT [5, 6, 7, 8]. Furthermore, in adipocytes, STC-1 binding sites were found on the mitochondrial membrane [7, 8]. Thus, modulation of the lipogenesis/lipolysis pathways by STC-1 could be assumed.

For this purpose, the present work is an *in vitro* investigation into the role of hSTC-1 in lipids synthesis and CO<sub>2</sub> production from <sup>14</sup>C-glucose, lipolysis stimulated by epinephrine, and ADP/ATP ratio in WRAT from fed rat.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Animals

The study was undertaken in accordance with ethics requirements and authorized (# 23583) by the official ethical committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Adult male Wistar rats weighing 300± 50g were maintained at room temperature of 22 ± 2°C and light/dark cycle of 12h/12h and water and food were available *ad libitum* until the moment of the experiment. Animals were killed and the WRAT was excised and sliced on ice-

cold dish containing Krebs Henseleit (KH) buffer, pH 7.4. WRAT slices from each rat were distributed between the control and experimental groups. In mammals, STC-1 acts as a paracrine, autocrine or intracrine factor [5], so in this study we chose to slice the WRAT because cellular isolation would compromise the communication between cells. Slices were pre-incubated for 15 min without hormones in 1 mL KH pH 7.4 equilibrated with O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5, v/v). Pre-incubation and incubation were performed in the Dubnoff metabolic incubator under constant shaking at 37°C. Control groups were incubated under the same conditions but without hormone.

## **2.2 Conversion of <sup>14</sup>C-glucose to <sup>14</sup>C-lipids**

After the pre-incubation time, WRAT (300±10 mg) slices were incubated for 60 min in flasks sealed with caps in 1 mL of KH pH 7.4 containing 1% fatty acid-free BSA, 0.2 µCi of [U-<sup>14</sup>C] glucose (55 mCi/mmol GE-Healthcare), plus 5 mM of unlabelled glucose, equilibrated with O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5, v/v) in the presence of 0.386 and 3.86 pM of hSTC-1 (recombinant human STC-1 was purchased from RayBiotech Inc., USA) [9,10]. Following incubation, the tissue slices were immediately homogenised in chloroform:methanol (2:1, v/v). Lipids were extracted according to Folch et al. [11] dissolved in toluene-PPO. Results were expressed as mmol of <sup>14</sup>C-glucose incorporated into <sup>14</sup>C-total lipids per g<sup>-1</sup> of tissue per h<sup>-1</sup> of incubation.

## **2.3 Conversion of <sup>14</sup>C-glucose to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>**

After pre-incubation, WRAT (300±10 mg) slices were incubated under the conditions described in 2.2. However, the flasks contained small glass wells inside that were attached to the rubber caps and above the level of the incubation medium, containing small strips of Whatman 3MM paper and 1 M Hyamine<sup>®</sup> hydroxide (0.2 mL) to trap the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced. Incubation was stopped by adding 0.2 mL of 50% TCA through the rubber cap. Subsequently, the glass wells were transferred to vials containing scintillation liquid [12]. Values of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production are expressed as nmol of <sup>14</sup>C glucose incorporated into CO<sub>2</sub> per g<sup>-1</sup> of tissue per h<sup>-1</sup> of incubation.

## **2.4 Lipolysis**

After the pre-incubation period, slices of WRAT (300±10 mg) were incubated in flasks sealed with caps in 1 mL of KH pH 7.4 containing 1% fatty acid-free BSA, equilibrated with O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5, v/v). Lipolysis was stimulated by

adding 20  $\mu\text{L}$  of epinephrine ( $2.5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ) solution in ascorbic acid (17.6 mg/mL) [13]. Slices were divided into five groups: 1) Control (without hSTC-1 or epinephrine), but with 20  $\mu\text{L}$  of ascorbic acid and incubated for 120 min; 2) hSTC-1 0.386 pM incubated for 60 min; 3) Epinephrine incubated for 60 min; 4) hSTC-1 0.386 pM (incubated for 60 min) followed by epinephrine and incubated for a further 60 min; 5) Epinephrine (incubated for 60 min) followed by hSTC-1 0.386 pM incubated for a further 60 min. The concentration of glycerol released into the incubation medium was determined enzymatically using a commercial kit (R-Biopharm<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany). Values are expressed as mg glycerol per 100 mg of tissue.

### **2.5 ADP/ATP Ratio**

After the pre-incubation period, WRAT ( $300 \pm 10$  mg) slices were incubated under the conditions described in 2.2, but in the presence of 0.386 pM of hSTC-1. ADP/ATP ratio in WRAT slices was determined immediately after the incubation period by a commercial kit (MAK135; Sigma Aldrich, USA).

### **2.6 Statistical analysis**

Results were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA), complemented with a Student–Newman-Keuls (SNK) test. Before applying the ANOVA test, results were checked for normality (Kolmogorof-Smirnov test) and homogeneity (Levene test) of data. Data were considered significant when  $P < 0.05$ . The tests were carried out using the statistics program in GraphPad Prism 5.0.

## **3. Results and Discussion**

The present study was the first to demonstrate an effect of hSTC-1 on lipogenesis in WRAT from rat (Figs. 1 and 5). TAG synthesis in the adipose tissue is influenced by different factors; the hormonal and nutritional controls are the most important. Our animals were maintained on a balanced diet until the moment of the experiment. In this nutritional state, hSTC-1 increased  $^{14}\text{C}$  incorporation from glucose into lipids (Figs. 1 and 4). This result indicates that hSTC-1, like insulin, has an anabolic effect on glucose metabolism in WRAT [14,15], emphasizing that this adipose tissue seems to be the main adipose depot responsible for the maintenance of energy homeostasis of the organism as a whole [16]. TAG accumulation occurs at the end of adipocyte differentiation, when the highest level of STC-1 expression was found [7]. Also,

the co-localization of STC-1 binding site and perilipin on lipid droplet membranes confirms that STC-1 acts in adipocytes [7].

The increased lipogenic capacity in the rat WRAT in fed state found in this study supports the hypothesis that the activity of the G3P-generating pathway (glycolysis) from glucose is regulated by hSTC-1 to maintain an adequate supply of G3P needed for fatty acid esterification and storage in WRAT, since the availability of G3P controls the esterification of FA and TAG synthesis [14]. Our results also suggest the effect of hSTC-1 on *de novo* fatty acid synthesis from pyruvate generated by  $^{14}\text{C}$ -glucose in the glycolysis pathway. Furthermore, hSTC-1 increased  $^{14}\text{C}$ -glucose oxidation in the glycolytic pathway. Effect of hSTC-1 on these pathways is supported by an 85% increase in  $^{14}\text{CO}_2$  production from  $^{14}\text{C}$ -glucose and maintenance of the ADP/ATP ratio in WRAT incubated in the presence of hSTC-1 (Figs. 2 and 5). This finding is reinforced by the presence of high affinity binding sites for STC-1 on mitochondrial membrane [17], suggesting a role for this hormone in cell metabolism. Although part of the  $^{14}\text{C}$ -glucose metabolic flux in the glycolytic pathway is directed towards G3P synthesis, the incubation of WRAT in the presence of hSTC-1 maintained an ADP/ATP ratio close to the control group (Fig. 3). During the synthesis of fatty acid from glucose, a net generation of ATP occurs within adipocytes [14, 15]. The number of ATP molecules produced per fatty acid molecule synthesized depends upon relative contributions of the pyruvate/malate cycle and the pentose phosphate pathway to supply NADPH [15].

Despite the co-localization of STC-1 binding sites and perilipin on lipid droplet membrane, the presence of hSTC-1 in the incubation medium did not inhibit epinephrine's lipolytic effect (Figs. 4 and 5). In rats in the fed state, perilipin A is minimally phosphorylated and forms a barrier at the surface of lipid droplets that restricts the access of cytosolic lipases to store triacylglycerols; consequently, lipolysis occurs at a very low rate [18]. Presence of STC-1 binding sites co-localized with perilipin in lipid droplets [7] supports the hypothesis that STC-1 contributes to decreased perilipin A phosphorylation, and perilipin A shields stored triacylglycerols from cytosolic lipases, thus promoting triacylglycerol storage in the fed state [18]. However, when catecholamines activate the  $\beta$ -adrenergic signalling cascade, hSTC-1

does not exercise an anti-lipolytic effect. Elucidation of this hypothesis requires further studies to determine the effect of STC-1 on perilipin A phosphorylation in WRAT.

In conclusion, it seems that hSTC-1 is one of the hormonal factors that in the fed state control glucose metabolism in WRAT, which is the main adipose depot responsible for maintenance of energy homeostasis of the organism as a whole, maintaining crosstalk with different organs in the body. In 1994, the role of adipose tissue as an endocrine organ was established, and the STC-1 hormone expressed in adipocytes may be the one which controls glucose metabolism locally (Fig. 5).

## Figures and Legends

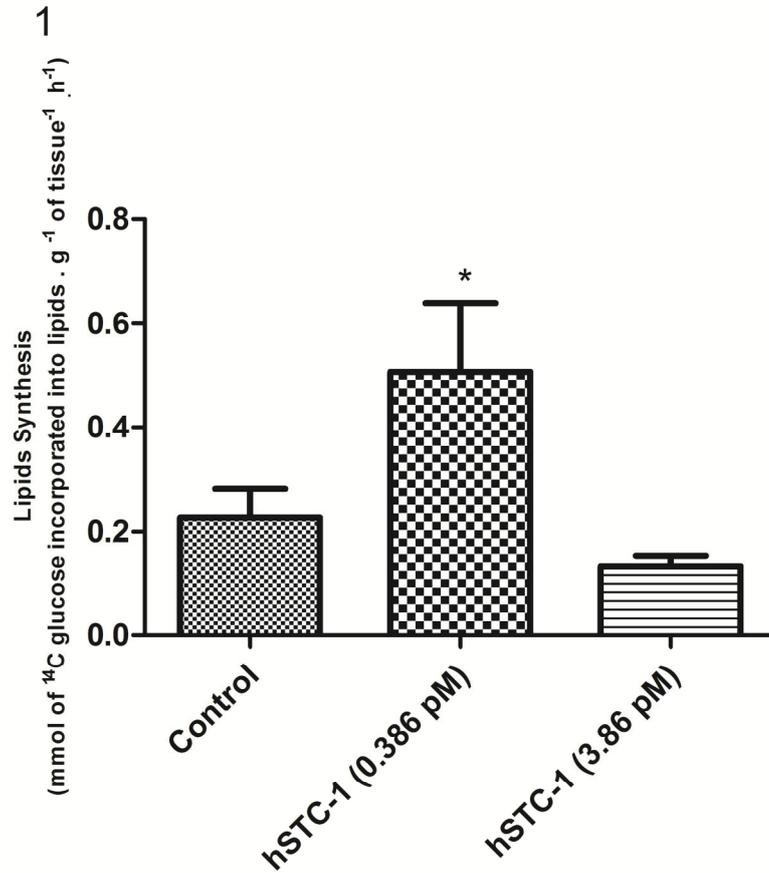


Fig. 1: Effect of hSTC-1 on the incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into total lipids in retroperitoneal white adipose tissue. Data are given as mean  $\pm$  SEM; Control n= 10, hSTC-1 (0.386) n= 6, hSTC-1 (3.86) n=6. \*  $P < 0.05$  compared to the control without hormone and 3.86 pM of hSTC-1.

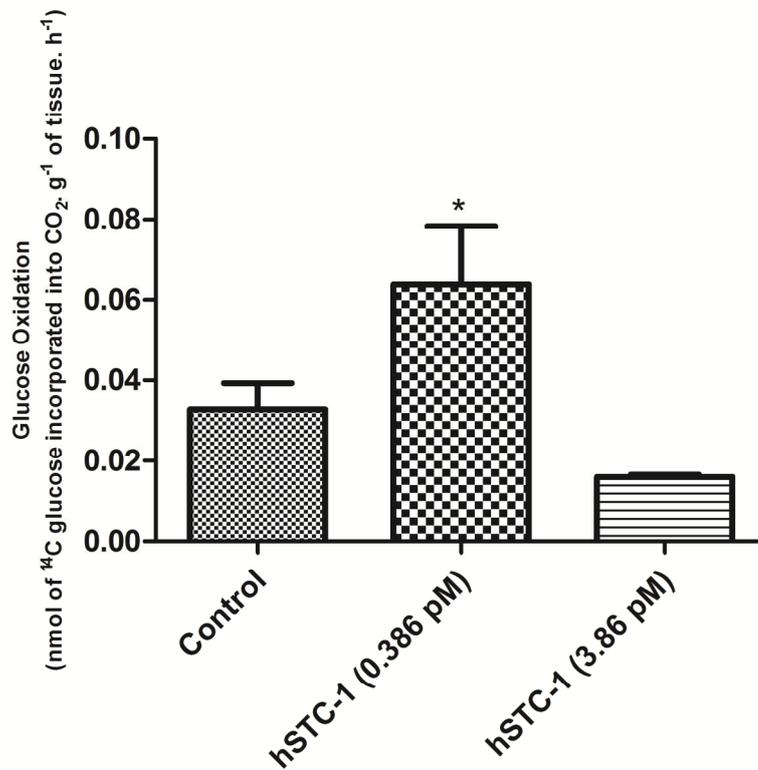


Fig. 2: Effect of hSTC-1 on the incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in rat retroperitoneal white adipose tissue. Data are given as mean ± SEM; Control n= 10, hSTC-1 (0.386) n= 9, hSTC-1 (3.86) n=6. \* *P*<0.05 compared to the control without hormone and 3.86 pM of hSTC-1.

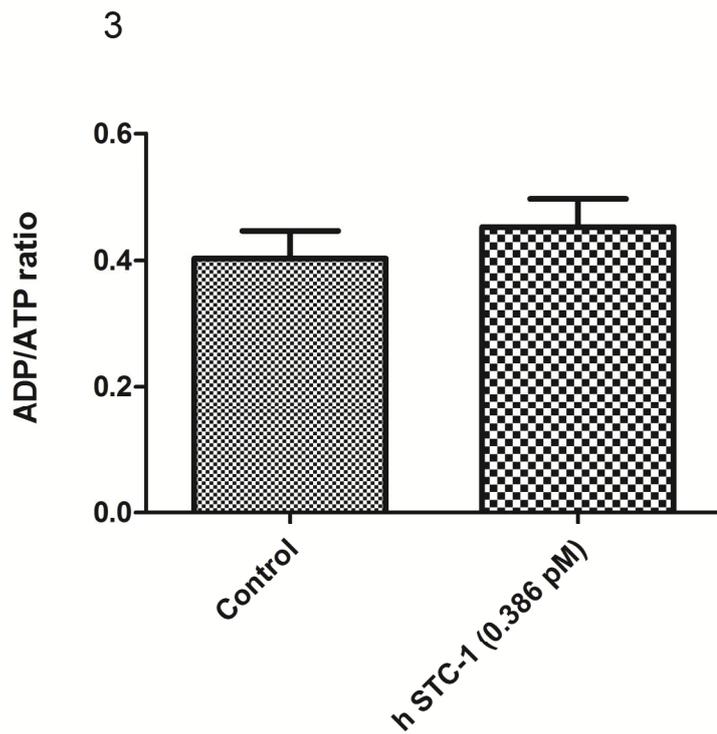


Fig. 3: Effect of 0.386 pM of hSTC-1 on the ADP/ATP ratio in rats retroperitoneal white adipose tissue. Data are given as mean  $\pm$  SEM; n = 5 animals. \*  $P < 0.05$  compared to the control without hormone.

4

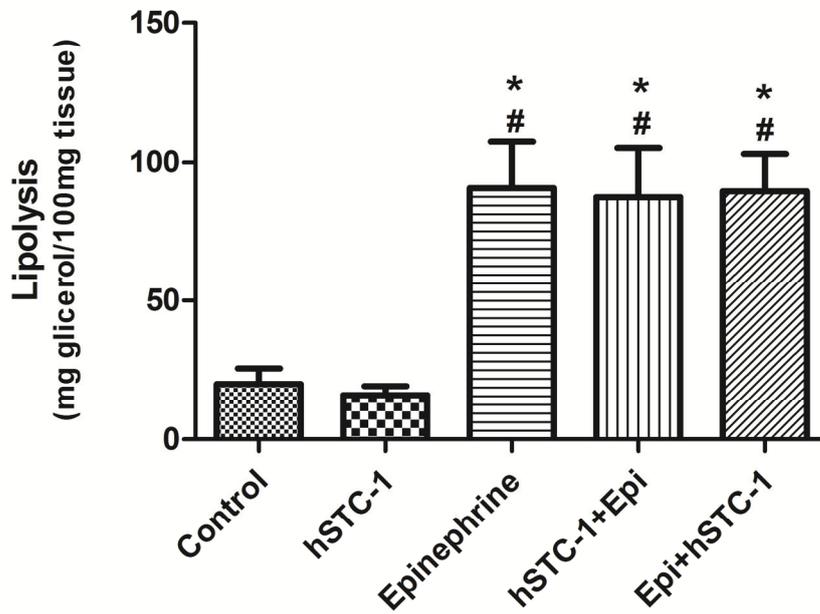


Fig. 4: Glycerol liberation from rat retroperitoneal white adipose tissue in incubation medium in response to a different combination of hSTC-1 (0.386 pM) and epinephrine ( $2.5 \cdot 10^{-4}M$ ) hormones. Data are given as mean  $\pm$  SEM; n = 8 animals. \*  $P < 0.05$  compared to the control without hSTC-1; #  $P < 0.05$  compared to 0.386 pM of hSTC-1.

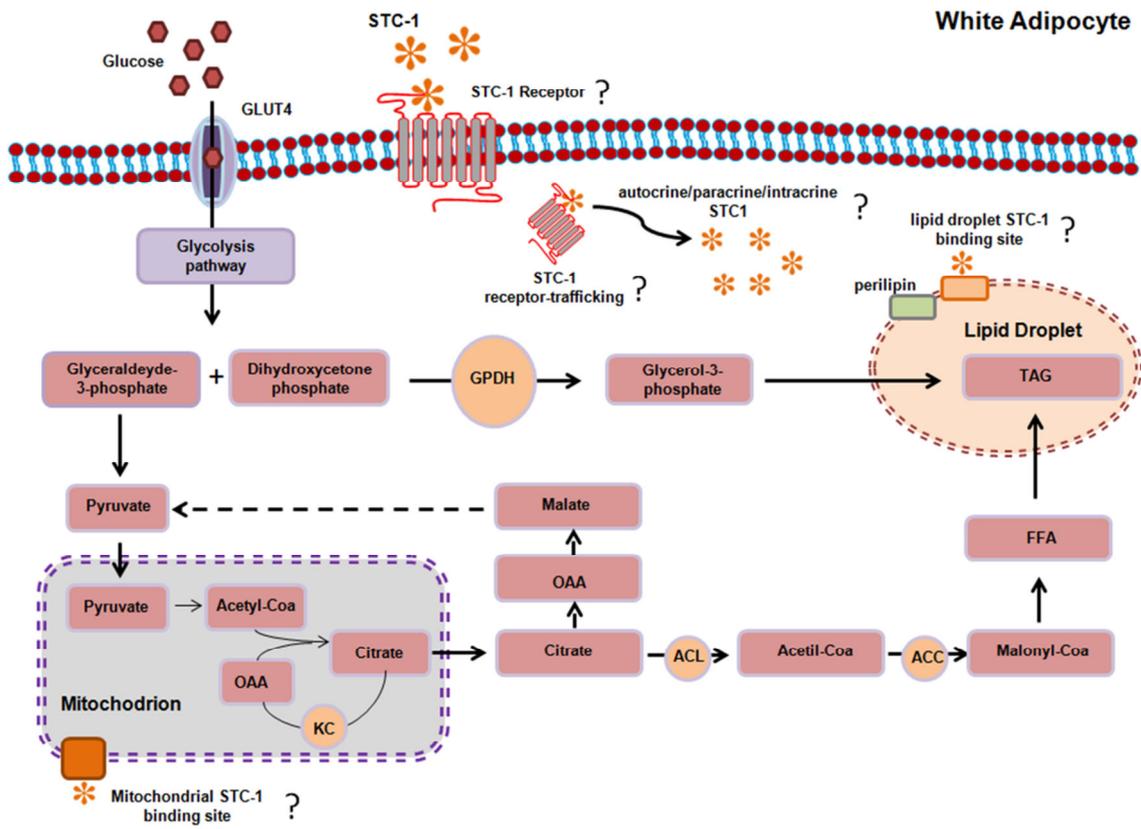


Fig. 5: Schematic representation of hSTC-1 mediated lipogenesis and glucose oxidation in rat retroperitoneal white adipose tissue identified in the present study. Thick lines represent metabolic pathways regulated by hSTC-1.

#### 4. References

1. Chaves VE, Frasson D, Kawashita NH (2011) Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie* 93:1631–1640. doi: 10.1016/j.biochi.2011.05.018
2. Nielsen TS, Jessen N, Jørgensen JOL, et al (2014) Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *J Mol Endocrinol*. doi: 10.1530/JME-13-0277
3. Wagner GF, Hampong M, Park CM, Copp DH (1986) Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius. *Gen Comp Endocrinol* 63:481–491. doi: 10.1016/0016-6480(86)90149-8
4. Wagner GF, Milliken C, Friesen HG, Copp DH (1991) Studies on the regulation and characterization of plasma stanniocalcin in rainbow trout. *Mol Cell Endocrinol* 79:129–138. doi: 10.1016/0303-7207(91)90103-Y
5. Yeung BHY, Law AYS, Wong CKC (2012) Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 349:272–280. doi: 10.1016/j.mce.2011.11.007
6. Serlachius M, Andersson LC (2004) Upregulated expression of stanniocalcin-1 during adipogenesis. *Exp Cell Res* 296:256–264. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.02.016
7. Serlachius M, Zhang KZ, Andersson LC (2004) Stanniocalcin in terminally differentiated mammalian cells. *Peptides* 25:1657–1662. doi: 10.1016/j.peptides.2004.03.031
8. Paciga M, Hirvi ER, James K, Wagner GF (2005) Characterization of big stanniocalcin variants in mammalian adipocytes and adrenocortical cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E197–205. doi: 10.1152/ajpendo.00581.2004
9. Schein V, Kucharski LC, Guerreiro PMG, et al (2015) Stanniocalcin 1 effects on the renal gluconeogenesis pathway in rat and fish. *Mol Cell Endocrinol* 414:1–8. doi: 10.1016/j.mce.2015.07.010
10. De Niu P, Radman DP, Jaworski EM, et al (2000) Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay: Serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 162:131–144. doi: 10.1016/S0303-7207(00)00199-4
11. Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509. doi: 10.1007/s10858-011-9570-9

12. Torres ILS, Vasconcellos AP, Silveira Cucco SN, Dalmaz C (2001) Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. *Brazilian J Med Biol Res* 34:241–244. doi: 10.1590/S0100-879X2001000200012
13. de Resende PE, Kaiser S, Pittol V, et al (2015) Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. *J Funct Foods* 15:440–451. doi: 10.1016/j.jff.2015.03.040
14. Proença ARG, Sertié RAL, Oliveira AC, et al (2014) New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian J Med Biol Res* 47:192–205. doi: 10.1590/1414-431X20132911
15. Wang CW (2015) Lipid droplets, lipophagy, and beyond. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1861:793–805. doi: 10.1016/j.bbalip.2015.12.010
16. Dos Santos MP, De França SA, Dos Santos JTF, et al (2012) A low-protein, high-carbohydrate diet increases fatty acid uptake and reduces norepinephrine-induced lipolysis in rat retroperitoneal white adipose tissue. *Lipids* 47:279–289. doi: 10.1007/s11745-011-3648-8
17. McCudden CR, Majewski A, Chakrabarti S, Wagner GF (2004) Co-localization of stanniocalcin-1 ligand and receptor in human breast carcinomas. *Mol Cell Endocrinol* 213:167–172. doi: 10.1016/j.mce.2003.10.042
18. Brasaemle DL, Subramanian V, Garcia A, et al (2009) Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol Cell Biochem* 326:15–21. doi: 10.1007/s11010-008-9998-8

## 4.2 Artigo2: Submetido para revista Biochimie em 05/12/2016

Effects of Stanniocalcin-1 on brown adipose tissue metabolism in rat

Aline G. Cozer \*; Márcia Trapp; Tiago L. Martins; Luciano Stürmer De Fraga; Claudia Vieira Marques; Jorge Felipe A. Model; Vanessa Schein; Luiz Carlos Kucharski; Roselis S. M. Da Silva

Post-Graduate Program in Biological Science: Physiology, Department of Physiology, Institute of Health Basic Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

### Abstract

The present work assesses *in vitro* the role of human Stanniocalcin 1 (hSTC-1) in  $^{14}\text{C}$ -glucose metabolism in brown adipose tissue (BAT) from fed rat. In the fed state, hSTC-1 decreases the incorporation of  $^{14}\text{C}$  from glucose to lipids in the rat BAT. The data support the hypothesis that the capacity of the glycerol-3-phosphate (G3P)-generating pathway (glycolysis) from glucose is regulated by hSTC-1, decreasing the adequate supply of G3P needed for fatty acid etherification and triacylglycerols storage in BAT. In addition, by decreasing lipogenesis, STC1 increased ATP levels and these two factors together may decrease BAT thermogenic function. The presence of hSTC-1 in the incubation medium did not alter  $^{14}\text{C}$  glucose and  $^{14}\text{C}$ -1-palmitic acid oxidation. The uncoupling protein 1 (UCP1) expression was not altered by hSTC-1 either. In conclusion, hSTC-1 is one of the hormonal factors that control glucose metabolism in BAT in the fed state.

### Keywords

Stanniocalcin 1; Brown adipose tissue metabolism, UCP-1.

### Abbreviations

BAT- brown adipose tissue

CS- Corpuscles Stannius

hSTC-1- human stanniocalin-1

TG - triacylglycerol

UCP 1 – uncoupling protein 1

WRAT- White Retroperitoneal Adipose Tissue

### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. RSMS and LCK are PQ-CNPq fellows, and AGC and JFAM are CNPq fellows, and VS is PNPd-CAPES fellow. The experiments were performed according to the current Brazilian laws.

**Conflict of interest:** We declare no conflict of interest.

\*Corresponding author:

Msc. Aline G Cozer

Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500

90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

e-mail: [alinecozer15@gmail.com](mailto:alinecozer15@gmail.com)

## 1. Introduction

Stanniocalcin 1 (STC1) secreted by the corpuscles of Stannius (CS) is an established hypocalcemic factor in bony fishes from where it was first isolated [1,2]. Recently it has been recognized that, as a result of the teleost-specific genome duplication, there are two fish STC1 isoforms encoded by different genes, of which STC1-A is strongly expressed in the CS and STC1-B is only faintly expressed in various tissues [3]. As in fishes, the mammalian STC-1 gene is widely expressed in tissues such as kidney, muscle, adrenal, heart, lung, ovary and white and brown adipose tissues [4,5].

However, outside of pregnancy and lactation, the mammalian hormone is undetectable in the blood of male and female [6]. The data indicate that mammalian STC1 is produced and secreted by one cell type and is sequestered and acts in neighboring cells, consistent with its paracrine/autocrine action [7]. The putative role of STC-1 on intermediary metabolism was demonstrated by the presence of binding sites for this hormone in liver and kidney mitochondria, where the hormone increases the electron transport [8]. Moreover, STC1 decreases ATP level in macrophages but does not affect the activity of respiratory chain complexes I-IV [9]. A metabolic role for STC has already been demonstrated in transgenic mouse with overexpressed STC; this mouse presented increased food and oxygen consumption in combination with reduced body weight [5,10]. This energy-wasting phenotype is likely due to the stimulatory effects of STC on mitochondrial electron transport [8], which in excess can result in mitochondrial hypertrophy [10]. Recently, Schein et al. (2015) demonstrated that STC-1 decreased the renal gluconeogenic activity in rat. In addition, the colocalization patterns of STC and perilipin in human white and brown fat cells [4,11] and the increase of carbon flux from glucose to lipids in white retroperitoneal adipose tissue in the fed rat [12] support the hypothesis of a central role for STC in lipid metabolism.

The brown adipose tissue (BAT) is the main tissue involved in non-shivering thermogenesis in mammals [13]. It was believed that this tissue is active only in small rodents or infants, but recent studies have shown BAT activity in human adults, mainly in the supraclavicular and paravertebral spaces and adjacent to the neck vessels [14–16]. BAT is densely vascularized, and the brown adipocytes have multilocular depots of triacylglycerols (TG) and a large

number of mitochondria [13,17]. Thermogenesis in BAT is accomplished via uncoupling protein 1 (UCP1) (or thermogenin), which is present in large amounts in BAT mitochondria and is responsible for uncoupling the ATP production and instead produce heat [11,13]. The proton leak via UCP1 is enhanced by long-chain fatty acid (FA) and inhibited at rest by cytosolic purine nucleotides, mainly ATP [17,18]. BAT also plays a role in glucose metabolism; cold activation normalized glucose tolerance and insulin resistance in obese mice fed high-fat diets [19]. UCP1 knockout mice present obese phenotype [13,17,20] and human leaner individuals have a higher activity of BAT metabolism [15,21,22].

BAT releases factors (BATokines) especially under conditions of thermogenic activation, such as triiodothyronine, insulin-like growth factor I, and interleukin-6 that act either on the secreting brown adipocytes (autocrine action) or on other cells types nearby (paracrine action) [23]. Serlachius et al. (2004) reported high STC-1 expression in brown human adipocytes. Would this hormone have an autocrine action on the metabolism of brown adipose tissue, controlling the thermogenic activity? For this purpose, the present work is an *in vitro* investigation into the role of human STC-1 (hSTC-1) in lipids synthesis and CO<sub>2</sub> production from <sup>14</sup>C-glucose, [1- <sup>14</sup>C] palmitic acid oxidation, ATP concentration, ADP/ATP ratio and UCP1 protein expression in brown adipose tissue from fed rat.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animals**

The study was undertaken in accordance with ethics requirements and authorized (#23583) by the official ethical committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Adult male Wistar rats weighing 300±50g were maintained at room temperature of 22 ± 2°C and light/dark cycle of 12h/12h and water and food were available *ad libitum* until the moment of the experiment. Animals were killed and the BAT was excised and sliced on ice-cold dish containing Krebs Henseleit (KH) buffer, pH 7.4. BAT slices (100±10 mg) from each rat were distributed between the control and experimental groups. Slices were pre-incubated for 15 min without hormones in 1 mL KH pH 7.4 equilibrated with O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5, v/v). After the pre-incubation time, BAT

slices were incubated for 60 min in flasks sealed with caps in 1 mL of KH pH 7.4 containing 1% fatty acid-free BSA in the presence of 0.386 and 3.86 pM and 38.6 pM of hSTC-1 (recombinant human STC-1 was purchased from RayBiotech Inc., USA) [9,10]. Pre-incubation and incubation were performed in the Dubnoff metabolic incubator under constant shaking at 37°C. Control groups were incubated under the same conditions but without hormone.

## **2.2 Conversion of $^{14}\text{C}$ -glucose to $^{14}\text{C}$ -lipids**

BAT pre-incubation and incubation were performed as described in 2.1. To the incubation medium was added 0.2  $\mu\text{Ci}$  of [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] glucose (55 mCi/mmol GE-Healthcare), plus 5 mM of unlabelled glucose, equilibrated with  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5, v/v). Following incubation, the tissue slices were immediately homogenized in chloroform:methanol (2:1, v/v). Lipids were extracted according to Folch et al. [26] dissolved in toluene-PPO. Results were expressed as mmol of  $^{14}\text{C}$ -glucose incorporated into  $^{14}\text{C}$ -total lipids. $\text{g}^{-1}$  of tissue. $\text{h}^{-1}$  of incubation.

## **2.3 Conversion of $^{14}\text{C}$ -glucose to $^{14}\text{CO}_2$**

BAT pre-incubation and incubation were performed as described in 2.1. However, the flasks contained small glass wells inside that were attached to the rubber caps and above the level of the incubation medium, containing small strips of Whatman 3MM paper and 1 M Hyamine<sup>®</sup> hydroxide (0.2 mL) to trap the  $^{14}\text{CO}_2$  produced. Incubation was stopped by adding 0.2 mL of 50% TCA through the rubber cap. Subsequently, the glass wells were transferred to vials containing scintillation liquid [27]. Values of  $^{14}\text{CO}_2$  production are expressed as  $\mu\text{mol}$  of  $^{14}\text{C}$  glucose incorporated into  $\text{CO}_2$ . $\text{g}^{-1}$  of tissue. $\text{h}^{-1}$  of incubation.

## **2.4 [1- $^{14}\text{C}$ ] Palmitic acid oxidation**

BAT slices were pre-incubated in Phosphate Buffer Solution (PBS) (pH 7.4) for 15 min. Incubation was performed in a medium containing PBS (pH 7.4), 0.05 M palmitic acid, 11.5 mg/mL free fatty acid BSA, 0.1  $\mu\text{Ci}$  1- $^{14}\text{C}$  palmitic acid in the presence of 0.386, 3.86 and 38.6 pM of hSTC-1 for 60 min at 37°C. Control groups were incubated under the same conditions but without hormone. The flasks contained small glass wells inside that were attached to the rubber caps and above the level of the incubation medium, containing small

strips of Whatman 3MM paper and 1 M Hyamine<sup>®</sup> hydroxide (0.25 mL) to trap the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced. The reaction was stopped by adding 400 µL of 2M cold acid citric (pH 1.5). The trapping of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> was continued on ice for additional 60 min. Subsequently, the glass wells were transferred to vials containing scintillation liquid. The following compounds were added to the incubation medium: 6 µmol unlabelled palmitic acid dissolved in 100 µL of ethanol and 0.6 mL of 6M perchloric acid (Fromenty). After 60 min the flasks were centrifugated at 3000 xg for 20 min at 4 °C, and the supernatant was filtered through a 2V Whatman paper. Acid-soluble β oxidation <sup>14</sup>C products were then counted adding the filtered supernatant in scintillation liquid.

## **2.5 ADP/ATP Ratio and ATP concentration**

BAT pre-incubation and incubation were performed as described in 2.1. ADP/ATP ratio in BAT slices was determined immediately after the incubation period using a commercial kit (MAK135; Sigma Aldrich, USA). Based on the ADP/ATP ratio results and the ATP standard curve, brown adipose tissue ATP concentrations were calculated.

## **2.6 Western blotting**

BAT pre-incubation and incubation were performed as described in 2.1, but in presence of 0.386, 3.86 and 38.6 pM of hSTC-1. Following incubation, tissue slices were immediately frozen on dry ice and stored at -80 °C until analysis. BAT was homogenized in lysis buffer (20 mMTris-HCl, 150 mMNaCl, 2.7 mMKCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1% Triton-X), pH 8.0, containing 1 µM PMSF and 10mMNaF besides 1% phosphatase inhibitor cocktail (Sigma – P0044) and 1% protease inhibitor cocktail (Sigma – P8340). Protein levels were quantified by the Bradford method [28]. BAT lysates (40 µg of protein) were separated under reducing conditions by SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (AmershamHybond-ECL, GE Healthcare; São Paulo, Brazil) using an electrophoretic transfer system (Bio-Rad; Hercules, CA). The membranes were incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-UCP1 primary antibody (1:3000; Abcam - ab10983) and processed for immunodetection using a goat-anti-rabbit-HRP-conjugated secondary antibody

(1:10000). Protein bands were detected with enhanced chemiluminescence (ECL; Merck Millipore) followed by exposure to the autoradiography film (Amersham). Immunoblots were scanned and the intensity of the bands was quantified by densitometry using ImageJ 1.50 software (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).  $\beta$ -actin was used as a loading control. Data were expressed in relation to the control group.

## **2.7 Statistical analysis**

Results were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), complemented with Student–Newman-Keuls (SNK) test. Before applying the ANOVA test, results were checked for normality (Kolmogorof-Smirnov test) and homogeneity (Levene test) of data. Data were considered significant when  $P < 0.05$ . The tests were carried out using the statistics program in GraphPad Prism 5.0.

### **3. Results**

#### **3.1 Incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into <sup>14</sup>C-lipids**

The incorporation of <sup>14</sup>C-glucose into total <sup>14</sup>C-lipids in BAT decreased about twofold (n= 7-10 animals each group; p=0.0095) after BAT incubation with both concentrations of hSTC-1 (0.386 pM and 3.86 pM) (Fig. 1).

#### **3.2 <sup>14</sup>C-glucose oxidation**

No significant variations in <sup>14</sup>C-glucose oxidation in the BAT were observed after 60 min of incubation in presence of different concentrations of hSTC-1 (n=10 animals each group; p= 0.6792) (Fig. 2).

#### **3.3 [1- <sup>14</sup>C] Palmitic acid oxidation**

No significant difference in <sup>14</sup>C- palmitic acid oxidation, acid-soluble products and total oxidation values was observed in BAT after incubation for 60 min in presence of different concentrations of hSTC-1 (Table 1). None of the palmitic acid oxidation parameters analyzed were influenced by different doses of hSTC. However, at 38.6 pM of hSTC-1, the <sup>14</sup>C- palmitic acid oxidation decreased 21% (P>0.05).

#### **3.4 ADP/ATP Ratio and ATP concentration**

The ADP/ATP ratio (Figure 3A) decreased about 23% in presence of 0.386 and 3.86 pM of hSTC-1 (p=0.1679; n= 5 animals each group). On the other hand, the ATP concentration increased fourfold after BAT incubation in presence of 0.386 pM of hSTC-1(Figure 3B). At 3.86 pM of hSTC-1 the ATP concentration in BAT had a threefold increase (p=0.0298; n= 5 animals each group).

#### **3.5 UCP1 protein expression**

No significant variations in UCP1 protein expression were observed (n= 4; p= 0.5522) after 60-min incubation in presence of 0.386, 3.86 and 38.6 pM of hSTC-1 (Fig. 4).

#### 4. Discussion

The presence of STC binding sites on the mitochondrial membrane and the evidence for direct effects of this hormone on the mitochondrial metabolism suggest that STC would be one of the factors that control the intermediary metabolism [29,30]. The present study was the first to demonstrate an effect of hSTC-1 on the BAT metabolism in fed rats. Several works have demonstrated that sympathetic innervation, through norepinephrine regulation of GLUT1 [31], and insulin, through stimulation of GLUT4 expression and translocation, are the major positive regulators of BAT glucose uptake [13]. In BAT, glucose is used for: 1) conversion to G3P by glycerophosphate dehydrogenase in the glycolytic pathway; 2) *de novo* lipogenesis; and 3) energy generation that supports FA esterification to TG synthesis and other adipocyte functions [13,17]. TG synthesis in BAT is influenced by different factors, the hormonal and nutritional controls being the most important ones [13,32,33].

In this study, the rats were maintained on a balanced diet until the moment of the experiment, and in this alimentary state hSTC-1 decreased the incorporation of  $^{14}\text{C}$  from glucose into total lipids. Unpublished data from our laboratory indicated no alteration of glucose uptake in rat BAT in fed state, after incubation in the same hSTC-1 concentrations used here. These data support the hypothesis that the activity of the G3P-generating pathway (glycolysis) from glucose is regulated by hSTC-1, decreasing the adequate supply of G3P needed for fatty acid esterification and storage in BAT, since G3P availability controls the FA esterification and TG synthesis [34].

Our results also suggest that the effect of hSTC-1 on *de novo* fatty acid synthesis from pyruvate generated by  $^{14}\text{C}$ -glucose in the glycolysis pathway is also decreased by hSTC1. An adequate level of TG for lipolysis and FA production are required for BAT thermogenic function [13]. Reduction in TG synthesis from glucose in BAT compromises BAT thermogenic capacity, because lipolysis-derived FA is the preferred substrate oxidized in BAT, providing most of the energy converted to heat by UCP1-mediated mitochondrial uncoupling [13].

Recently, Cozer et al. (2016) demonstrated that hSTC-1 in white retroperitoneal adipose tissue (WRAT) increase the incorporation of  $^{14}\text{C}$  from glucose in total lipids. The antagonism in the hSTC-1 actions on the lipids

synthesis from glucose in BAT and WRAT can be explained by the functional and ontogenetic differences between the two tissues. Adipocyte pluripotent stem cells first differentiate into mesenchymal stem cells that can become CD24<sup>+</sup> and PPAR $\gamma$ <sup>+</sup> white preadipocytes and Myf5<sup>+</sup> brown preadipocytes [35]. WRAT seems to be the main adipose depot responsible for the maintenance of energy homeostasis of the organism as a whole [36]. BAT has the function of producing heat with energy dissipation [17]. The high number of mitochondria and oxidative enzymes content in BAT give it a marked oxidative ability and glucose is one of the preferred substrates. BAT incubation in the presence of hSTC-1 maintained <sup>14</sup>C-glucose and <sup>14</sup>C-palmitic acid oxidation capacities similar to the control groups (without hormone).

It is noteworthy that the rats were fed and maintained in constant temperature, so FA and glucose oxidation for non-shivering thermogenesis and energy generation for other adipocyte functions, respectively, are not required [13,17]. There are reasons to suppose that a transfer of glucose carbon from lipid synthesis to glycogen synthesis may have occurred, since significant amounts of glucose in BAT are also stored as glycogen and converted to lactate by anaerobic glycolysis, producing ATP that might be important in compensating for reduced energy production due to mitochondrial uncoupling [34]. Elucidation of this point requires further studies with simultaneous measurements of the incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into glycogen and lipids.

The increase in ATP concentration and the 23% decrease in the ADP/ATP ratio in BAT after incubation in 3.86 pM of hSTC-1 suggests a decrease in heat production and energy dissipation. Moreover, the decrease in lipids synthesis from <sup>14</sup>C-glucose reduces energy expenditure, which contributes to the increase of ATP level. Although hSTC-1 does not significantly alter the expression of the UCP1 protein, the high ATP level would lead the UCP-1 to a “tight” state with no transport activity [18]. Thus, the decrease in the TG synthesis/mobilization cycle induced by hSTC-1 reduces the energy converted to heat mediated by mitochondrial UCP1, because the interaction of UCP 1 with FA changes the protein conformation and proton transport occurs [18]. In contrast, in mouse and murine macrophages, hSTC-1 induces UCP-2 expression, decreasing mitochondrial membrane potential and superoxide generation, which is important for macrophage function and viability [37].

In conclusion, hSTC-1 is one of the hormonal factors that, in the fed state, controls glucose metabolism in BAT, which is the main tissue involved in non-shivering thermogenesis in mammals. The role of hSTC-1 in decrease of TG capacity synthesis from  $^{14}\text{C}$ -glucose compromises the BAT thermogenic capacity. Furthermore, the increase in ATP levels would inhibit a futile cycle via UCP1, which dissipates oxidative energy as heat.

Is it possible that the STC-1 hormone expressed in BAT controls the glucose metabolism locally?

## Figures and Legends

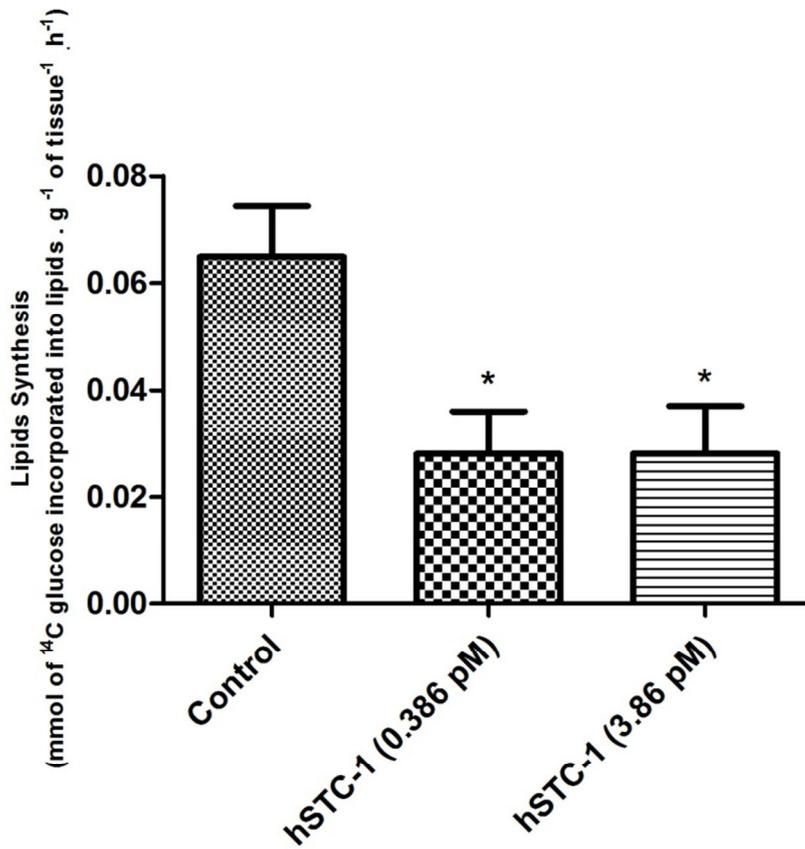


Fig. 1: Effect of hSTC-1 on the incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into lipids in brown adipose tissue. Data are given as mean  $\pm$  SEM; Control n= 10, hSTC-1 (0.386 pM) n= 7, hSTC-1 (3.86 pM) n=7. \*  $P < 0.05$  compared to the control without hormone and 3.86 pM of hSTC-1.

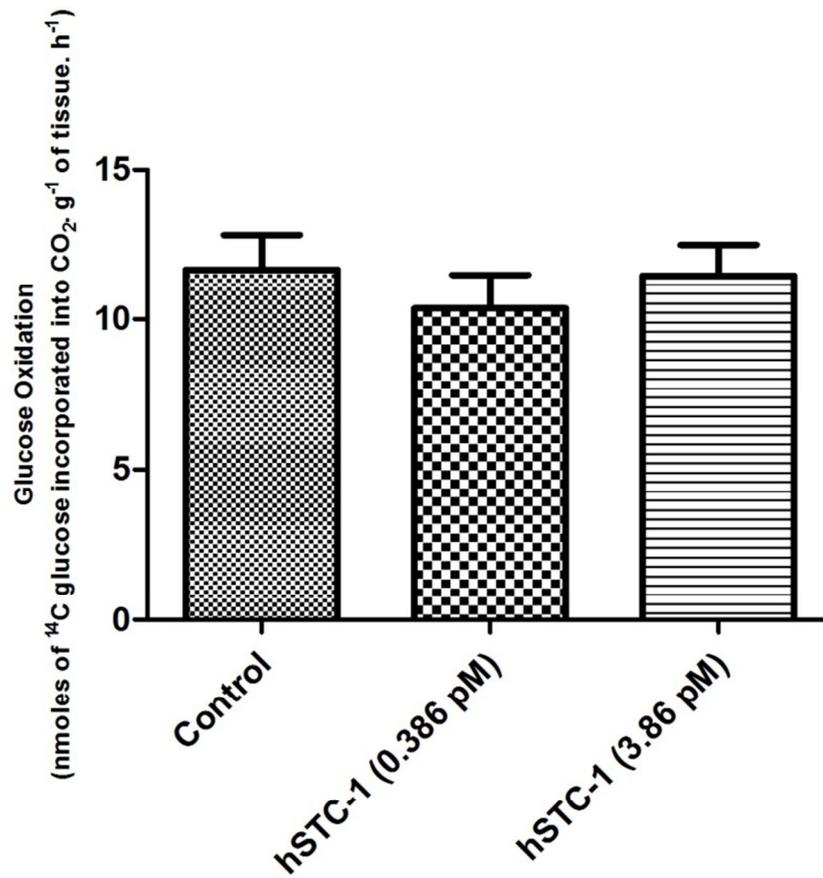


Fig. 2: Effect of hSTC-1 on the incorporation of <sup>14</sup>C from glucose into <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in rat brown adipose tissue. Data are given as mean ± SEM; n= 10 animals.

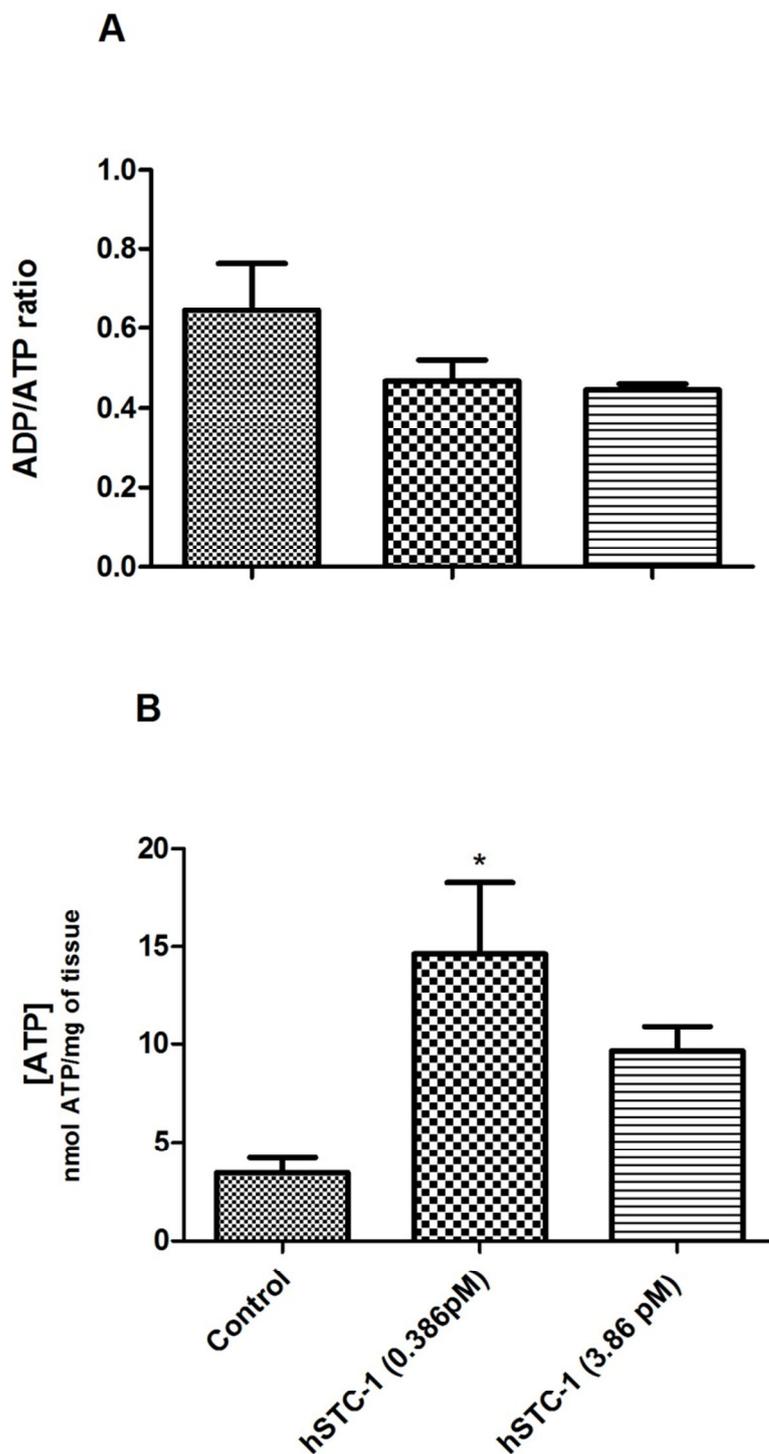


Fig. 3 A and B: Effect of 0.386 pM of hSTC-1 on the ADP/ATP ratio (A) and ATP concentration (B) in rats brown adipose tissue. Data are given as mean  $\pm$  SEM; n = 5 animals. \*  $P < 0.05$  compared to the control without hormone.

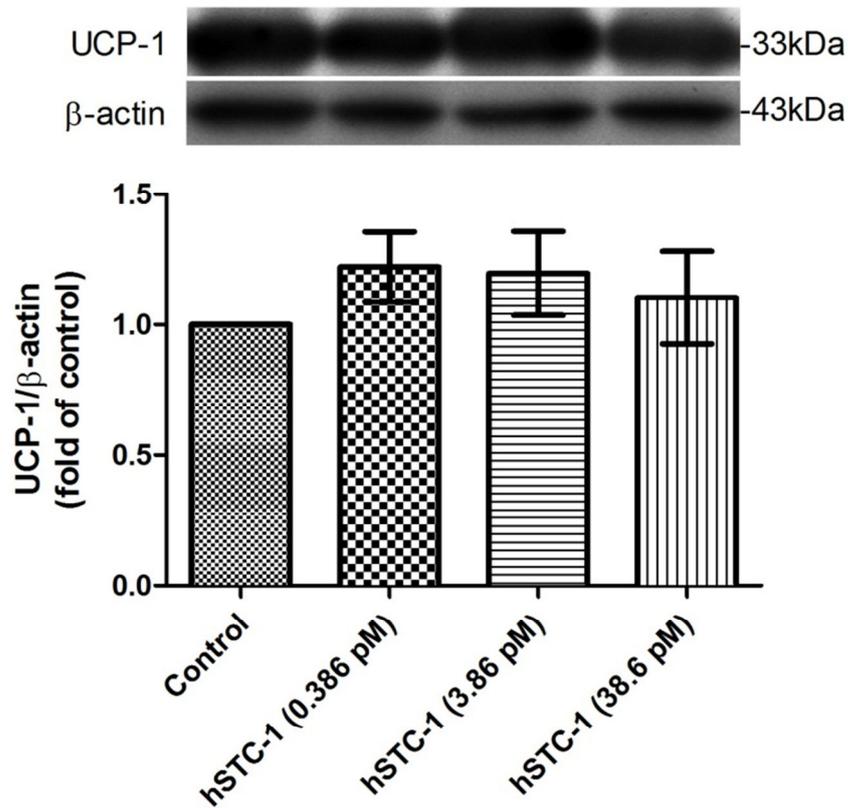


Fig. 4: Expression of uncoupling protein 1 (UCP-1) in brown adipose tissue following incubation with hSTC-1. Representative Western blot bands are shown on the top of histograms.  $\beta$ -actin was used as a loading control for densitometry analysis as shown in the graph. Data are given as mean  $\pm$  SEM (n=4) and were expressed in relation to the control group. No significant differences were found (ANOVA,  $p>0.05$ ).

Table 1 Products of free fatty acid oxidation. Incorporation of  $^{14}\text{C}$  from palmitic acid into  $^{14}\text{CO}_2$ , acid-soluble  $\beta$ -oxidation  $^{14}\text{C}$  products and total  $^{14}\text{C}$  products in brown adipose tissue incubated with different doses of hSTC-1.

	<b>CO<sub>2</sub></b> (mmol <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	<b>Acid-soluble <math>\beta</math>- oxidation <sup>14</sup>C products</b> (mmol <sup>14</sup> C .g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	<b>Total <sup>14</sup>C products</b> (mmol <sup>14</sup> C.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Control</b>	25.05 ± 3.51 (10)	4281 ± 325.9 (10)	4.30 ± 0.32 (10)
<b>hSTC-1 (0.386 pM)</b>	23.64 ± 2.12 (10)	3496 ± 218.4 (10)	3.52 ± 0.22 (10)
<b>hSTC-1 (3.86 pM)</b>	22.21 ± 2.60 (10)	3661 ± 228.3 (10)	3.68 ± 0.23 (10)
<b>hSTC-1 (38.6 pM)</b>	19.81 ± 2.54 (9)	3574 ± 232 (9)	3.59 ± 0.23 (9)

The data are represented as the mean ± SE with the number of rats in parentheses.

No significant differences were found (ANOVA,  $p > 0.05$ ).

## 5. References

- [1] G.F. Wagner, M. Hampong, C.M. Park, D.H. Copp, Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius, *Gen. Comp. Endocrinol.* 63 (1986) 481–491. doi:10.1016/0016-6480(86)90149-8.
- [2] G.F. Wagner, C. Milliken, H.G. Friesen, D.H. Copp, Studies on the regulation and characterization of plasma stanniocalcin in rainbow trout, *Mol. Cell. Endocrinol.* 79 (1991) 129–138. doi:10.1016/0303-7207(91)90103-Y.
- [3] V. Schein, J.C.R. Cardoso, P.I.S. Pinto, L. Anjos, N. Silva, D.M. Power, A.V.M. Canário, Four stanniocalcin genes in teleost fish: Structure, phylogenetic analysis, tissue distribution and expression during hypercalcemic challenge, *Gen. Comp. Endocrinol.* 175 (2012) 344–356. doi:10.1016/j.ygcen.2011.11.033.
- [4] M. Serlachius, K.Z. Zhang, L.C. Andersson, Stanniocalcin in terminally differentiated mammalian cells, *Peptides.* 25 (2004) 1657–1662. doi:10.1016/j.peptides.2004.03.031.
- [5] R. Varghese, C.K.C. Wong, H. Deol, G.F. Wagner, G.E. Dimattia, Comparative analysis of mammalian stanniocalcin genes, *Endocrinology.* 139 (1998) 4714–4725. doi:10.1210/en.139.11.4714.
- [6] P. De Niu, H.S. Olsen, R. Gentz, G.F. Wagner, Immunolocalization of stanniocalcin in human kidney, *Mol. Cell. Endocrinol.* 137 (1998) 155–159.
- [7] B.H.Y. Yeung, A.Y.S. Law, C.K.C. Wong, Evolution and roles of stanniocalcin, *Mol. Cell. Endocrinol.* 349 (2012) 272–280. doi:10.1016/j.mce.2011.11.007.
- [8] C.R. McCudden, A. Majewski, S. Chakrabarti, G.F. Wagner, Co-localization of stanniocalcin-1 ligand and receptor in human breast carcinomas, *Mol. Cell. Endocrinol.* 213 (2004) 167–172. doi:10.1016/j.mce.2003.10.042.
- [9] Y. Wang, L. Huang, M. Abdelrahim, Q. Cai, A. Truong, Stanniocalcin-1 suppresses superoxide generation in macrophages through induction of mitochondrial UCP2, *J. Leukoc. Biol.* 86 (2009) 981–988. doi:10.1189/jlb.0708454.
- [10] E.H. Filvaroff, S. Guillet, C. Zlot, M.I.N. Bao, G. Ingle, H. Steinmetz, J. Hoeffel, S. Bunting, J.E.D. Ross, R.A.D. Carano, L.Y.N. Powell-braxton, G.F. Wagner, R. Eckert, M.E. Gerritsen, D.M. French, Stanniocalcin 1 Alters Muscle and Bone Structure and Function in Transgenic Mice, *Endocrinology.* 143

(2002) 3681–3690. doi:10.1210/en.2001-211424.

[11] M. Serlachius, L.C. Andersson, Upregulated expression of stanniocalcin-1 during adipogenesis, *Exp. Cell Res.* 296 (2004) 256–264. doi:10.1016/j.yexcr.2004.02.016.

[12] A.G. Cozer, M. Trapp, C. Vieira Marques, T.L. Martins, J.F.A. Model, V. Schein, L.C. Kucharski, R.S.M. Da Silva, Stanniocalcin 1 Enhances Carbon Flux from Glucose to Lipids in White Retroperitoneal Adipose Tissue in the Fed Rat, *Lipids.* 51 (2016). doi:10.1007/s11745-016-4202-5.

[13] B. Cannon, J.A.N. Nedergaard, Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003.

[14] M.C. Zingaretti, F. Crosta, A. Vitali, M. Guerrieri, A. Frontini, B. Cannon, J. Nedergaard, S. Cinti, The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue., *FASEB J.* 23 (2009) 3113–3120. doi:10.1096/fj.09-133546.

[15] K. Virtanen, M. Lidell, J. Orava, M. Heglind, R. Westergren, T. Niemi, M. Taittonen, J. Laine, N. Savisto, S. Enerbäck, P. Nuutila, Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults, *N. Engl. J. Med.* (2009).

[16] A. Cypess, S. Lehman, G. Williams, Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans, *Natl. Inst. Heal.* 360 (2009) 1509–1517. doi:10.1056/NEJMoa0810780.Identification.

[17] R. Thoonen, A.G. Hindle, M. Scherrer-Crosbie, Brown adipose tissue: The heat is on the heart., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310 (2016) H1592-605. doi:10.1152/ajpheart.00698.2015.

[18] F. Bouillaud, M.C. Alves-Guerra, D. Ricquier, UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863 (2016) 2443–2464. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.04.013.

[19] A. Bartelt, O.T. Bruns, R. Reimer, H. Hohenberg, H. Ittrich, K. Peldschus, M.G. Kaul, U.I. Tromsdorf, H. Weller, C. Waurisch, A. Eychmüller, P.L.S.M. Gordts, F. Rinninger, K. Bruegelmann, B. Freund, P. Nielsen, M. Merkel, J. Heeren, Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance, *Nat. Med.* 17 (2011) 200–205. doi:10.1038/nm.2297.

[20] H.M. Feldmann, V. Golozoubova, B. Cannon, J. Nedergaard, Short Article UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced

Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality, *Cell Metab.* 9 (2009) 203–209. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.014.

[21] K.A. Virtanen, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism The rediscovery of BAT in adult humans using imaging, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30 (2016) 471–477. doi:10.1016/j.beem.2016.09.001.

[22] M.J. Vosselman, W.D. van Marken Lichtenbelt, P. Schrauwen, Energy dissipation in brown adipose tissue: From mice to men, *Mol. Cell. Endocrinol.* 379 (2013) 43–50. doi:10.1016/j.mce.2013.04.017.

[23] J. Villarroya, R. Cereijo, F. Villarroya, An endocrine role for brown adipose tissue?, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* (2013). doi:10.1152/ajpendo.00250.2013.

[24] V. Schein, L.C. Kucharski, P.M.G. Guerreiro, T.L. Martins, I. Morgado, D.M. Power, A.V.M. Canario, R.S.M. da Silva, Stanniocalcin 1 effects on the renal gluconeogenesis pathway in rat and fish, *Mol. Cell. Endocrinol.* 414 (2015) 1–8. doi:10.1016/j.mce.2015.07.010.

[25] P. De Niu, D.P. Radman, E.M. Jaworski, H. Deol, R. Gentz, J. Su, H.S. Olsen, G.F. Wagner, Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay: Serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat, *Mol. Cell. Endocrinol.* 162 (2000) 131–144. doi:10.1016/S0303-7207(00)00199-4.

[26] J. Folch, M. Lees, G.H.S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J Biol Chem.* 226 (1957) 497–509. doi:10.1007/s10858-011-9570-9.

[27] I.L.S. Torres, A.P. Vasconcellos, S.N. Silveira Cucco, C. Dalmaz, Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 34 (2001) 241–244. doi:10.1590/S0100-879X2001000200012.

[28] M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.* 254 (1976) 248–254.

[29] J.P. Ellard, C.R. McCudden, C. Tanega, K.A. James, S. Ratkovic, J.F. Staples, G.F. Wagner, The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and

its actions are modulated by nucleotide triphosphates, *Mol. Cell. Endocrinol.* 264 (2007) 90–101. doi:10.1016/j.mce.2006.10.008.

[30] C.R. McCudden, K.A. James, C. Hasilo, G.F. Wagner, Characterization of Mammalian Stanniocalcin Receptors, *J. Biol. Chemistry.* 277 (2002) 45249–45258. doi:10.1074/jbc.M205954200.

[31] O.S. Dallner, E. Chernogubova, K.A. Brolinson, T. Bengtsson, B3-Adrenergic Receptors Stimulate Glucose Uptake in Brown Adipocytes By Two Mechanisms Independently of Glucose Transporter 4 Translocation, *Endocrinology.* 147 (2006) 5730–5739. doi:10.1210/en.2006-0242.

[32] N.H. Kawashita, W.T. Festuccia, M.N. Brito, M.A. Moura, S.R. Brito, M.A. Garofalo, I.C. Kettelhut, R.H. Migliorini, Glycerokinase activity in brown adipose tissue: a sympathetic regulation?, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282 (2002) R1185-90. doi:10.1152/ajpregu.00419.2001.

[33] V.E. Chaves, D. Frasson, M.E. Martins-Santos, L.C. Navegantes, V.D. Galban, M.A. Garofalo, I.C. Kettelhut, R.H. Migliorini, Fatty acid synthesis and generation of glycerol-3-phosphate in brown adipose tissue from rats fed a cafeteria diet, *Can J Physiol Pharmacol.* 86 (2008) 416–423. doi:y08-052 [pii]r10.1139/y08-052.

[34] W.T. Festuccia, P. Blanchard, Y. Deshaies, Control of brown adipose tissue glucose and lipid metabolism by PPAR  $\gamma$ , *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2 (2011) 1–6. doi:10.3389/fendo.2011.00084.

[35] A.M. Unser, Y. Tian, Y. Xie, Opportunities and challenges in three-dimensional brown adipogenesis of stem cells, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 962–979. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.07.005.

[36] D. Frasson, R.P. Boschini, V.E. Chaves, M.E.S.M. Dos Santos, S.D.P. Gomes, R.R. Valentim, M.A.R. Garófalo, L.C.C. Navegantes, R.H. Migliorini, I.D.C. Kettelhut, The sympathetic nervous system regulates the three glycerol-3P generation pathways in white adipose tissue of fasted, diabetic and high-protein diet-fed rats, *Metabolism.* 61 (2012) 1473–1485. doi:10.1016/j.metabol.2012.03.014.

[37] D. Sheikh-Hamad, Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 298 (2010) F248-54. doi:10.1152/ajprenal.00260.2009.

## 5. DISCUSSÃO

Nosso estudo foi o primeiro a mostrar o efeito da hSTC-1 sobre a via lipogênica do TAB de ratos. A síntese de triacilglicerol (TAG) chamada de “lipogênese *de novo*” é caracterizada como a síntese de ácidos graxos a partir de substratos não lipídicos como, por exemplo, os carboidratos. Essa síntese de TAG ocorre no tecido adiposo e no fígado e é influenciada por muitos fatores, dentre os quais, podemos destacar os fatores hormonais, onde a insulina é o principal fator hormonal regulatório dessa via metabólica, e o estado alimentar do indivíduo e a composição da dieta modificam a ativação da via lipogênica (PROENÇA et al., 2014).

Os animais utilizados nesse estudo permaneceram alimentados com uma dieta balanceada até o momento que antecedia os experimentos. Assim como a insulina, no estado alimentado, a STC1 mostrou efeito anabólico sobre o metabolismo da glicose no TAB, pois aumentou a incorporação de  $^{14}\text{C}$  glicose em lipídios.

O acúmulo de TAG nos adipócitos ocorre na fase final da diferenciação celular onde, nessa mesma fase, encontramos os maiores níveis de expressão de hSTC-1 nessas células (SERLACHIUS et al., 2004). A co-localização do sítio de ligação da hSTC-1 e as perilipinas na membrana da gota lipídica nos adipócitos confirma a ação da nessas células (SERLACHIUS et al., 2004; SERLACHIUS; ANDERSSON, 2004).

O aumento da atividade lipogênica no TAB durante o estado alimentado confirma a hipótese de que a via de produção de G3P a partir da glicose (glicólise) parece ser regulada pela hSTC-1 para que a quantidade de G3P necessária para a síntese e armazenamento de TAG fosse mantida. A hSTC-1

mostra um efeito importante no aumento da produção de TAG *de novo* a partir do  $^{14}\text{C}$  glicose-piruvato gerado na via glicolítica.

Além da hSTC-1 direcionar o fluxo de  $^{14}\text{C}$  glicose para a formação de G3P na via glicolítica, nós também observamos o aumento da entrada do piruvato formado no ciclo do ácido cítrico. Esse efeito da hSTC-1 é observado pelo aumento de 85% na oxidação da  $^{14}\text{C}$  glicose e manutenção da razão ADP/ATP e dos níveis celulares de ATP no TAB (figura 14 - anexo da tese) quando incubado com hSTC-1. Esse achado é reforçado pela presença de sítios de ligação de alta afinidade pela hSTC-1 nas mitocôndrias, o que nos sugere um papel desse hormônio no metabolismo celular (MCCUDDEN et al., 2002). Além disso, durante a síntese dos ácidos graxos a partir da glicose, ocorre uma rede de geração de ATP dentro dos adipócitos. O número de moléculas de ATP produzidas por molécula de ácido graxo sintetizado depende do suprimento de NADPH a partir do ciclo piruvato/malato e da via das pentoses fosfato e também do ATP utilizado na carboxilação do piruvato (KOPECKÝ et al., 2002; WANG, 2015).

Apesar da co-localização dos sítios de ligação da hSTC-1 e das perilipinas na membrana das gotas lipídicas, a hSTC-1 não inibiu o efeito lipolítico da adrenalina no TAB incubado com hSTC-1. Em ratos alimentados, a perilipina A é minimamente fosforilada e, assim, forma uma barreira na superfície da gota lipídica que restringe o acesso das lipases citosólica aos estoques de TAG, conseqüentemente, a atividade lipolítica é bem reduzida (BRASAEMLE et al., 2009). A co-localização dos sítios de ligação da STC-1 e das perilipinas confirma a hipótese de que a STC-1 contribui para a diminuição da fosforilação da perilipina A, protegendo os estoques de TAG das lipases citosólica e, assim, facilitando o acúmulo de TAG. No entanto, quando as catecolaminas ativam a cascata de sinalização  $\beta$  adrenérgica a hSTC-1 não mostra um efeito antilipolítico. Como foi dito anteriormente, os animais desse estudo estavam no estado alimentado. Assim, neste cenário, a ação da insulina ativaria a fosfodiesterase, diminuindo o AMPc celular e inibindo a lipólise (Almadian, 2009). Porém, apesar de identificarmos o efeito lipogênico

semelhante ao da insulina, a hSTC-1 não foi capaz de inibir a lipólise. Gu et al. (2015) mostraram que a STC de peixe promove o aumento do AMPc celular nas brânquias de enguias. Entretanto, em mamíferos, muito pouco se sabe sobre a transdução intracelular do sinal da STC-1. Porém, Schein et al. (2015) constataram que em células HEK293 (Human Embryonic Kidney) a hSTC-1 inibiu a formação de AMPc estimulado pela forskolina.

A alta concentração de mitocôndrias no TAM e a presença de sítios de ligação para STC-1 nas mitocôndrias nos fez levantar a hipótese da participação da STC-1 sobre a regulação do metabolismo intermediário nesse tecido. Nosso trabalho é o primeiro estudo a demonstrar um efeito da hSTC-1 sobre metabolismo intermediário em TAM de ratos em estado alimentado. Muitos trabalhos demonstram que a inervação simpática do TAM, por meio da regulação de GLUT1 pela noradrenalina (DALLNER et al., 2006), e a insulina, estimulando a expressão e a translocação do GLUT4, são os principais reguladores da captação de glicose no TAM (CANNON; NEDERGAARD, 2004). No TAM a glicose é usada para: 1) conversão em G3P pela glicerofosfato desidrogenase na via glicolítica; 2) lipogênese *de novo*; 3) geração de energia que torna possível a esterificação de ácidos graxos em triacilglicerol e outras funções que requerem energia nos adipócitos marrom (CANNON; NEDERGAARD, 2004; THOONEN et al., 2016).

A síntese de TAG no TAM é influenciada por diferentes fatores; o controle hormonal e nutricional é o mais importante. Nesse estudo, os ratos estavam alimentados até o momento da realização dos experimentos, e nesse estado alimentar a hSTC-1 diminuiu a incorporação do  $^{14}\text{C}$  da glicose em lipídios. Dados do nosso grupo de estudo, utilizando o mesmo protocolo experimental, mostraram que a hSTC-1 não altera a captação de glicose no TAM (dados não publicados). Esse resultado confirma a hipótese de que a hSTC-1 controla a capacidade de geração de G3P (glicólise) a partir da glicose, diminuindo a concentração de G3P necessária para a esterificação de ácidos graxos e formação de TG no TAM, uma vez que a quantidade de G3P controla a capacidade de esterificação e, conseqüentemente, a síntese de TAG

(FESTUCCIA et al., 2011). Nossos resultados mostram também um efeito da hSTC-1 na diminuição da síntese *de novo* de ácidos graxos a partir do piruvato proveniente da oxidação  $^{14}\text{C}$ -glicose na via glicolítica. Uma concentração adequada de TAG para a liberação de ácidos graxos é necessária para a função termogênica do TAM. A redução da síntese de TAG a partir da  $^{14}\text{C}$ -glicose no TAM compromete a atividade termogênica desse tecido, pois os ácidos graxos derivados da lipólise das reservas de TG no TAM são os substratos preferidos para a oxidação de ácidos graxos que promove a geração de calor a partir do desacoplamento mitocondrial pela UCP-1 (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

A presença de hSTC-1 não alterou significativamente a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -1-ácido palmítico e de  $^{14}\text{C}$ -glicose. Apesar da diminuição na incorporação do  $^{14}\text{C}$  da glicose em lipídios, a incubação do TAM em presença de hSTC-1 manteve as capacidades de oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose e de  $^{14}\text{C}$ -ácido palmítico em valores similares aqueles dos grupos controle (sem hormônio). Saliendo que os ratos estavam alimentados e mantidos sob temperatura constante, as oxidações de ácido graxo e de glicose para a termogênese e a geração de energia, para outras funções dos adipócitos marrom, não eram requeridas (CANNON; NEDERGAARD, 2004; THOONEN et al., 2016). Além disso, a função anaplerótica da glicose é importante no TAM a partir da síntese dos intermediários do ciclo do ácido cítrico (OWEN et al., 2002).

A transferência de carbonos da  $^{14}\text{C}$ -glicose da síntese de lipídios para a síntese de glicogênio não pode ser descartada, pois parte da glicose no TAM é convertida em glicogênio e após a lactato pela glicólise anaeróbia, produzindo ATP importante para compensar a redução de produção de energia devido à ação da UCP-1 na mitocôndria (CANNON; NEDERGAARD, 2004; FESTUCCIA et al., 2011). Esclarecimentos sobre esta suposição necessitam de estudos com a simultânea medida de incorporação do  $^{14}\text{C}$  da glicose em glicogênio e em lipídios. O aumento da concentração de ATP e a diminuição em 23% da relação ADP/ATP no TAM após a incubação com 3,86 pM de hSTC-1 sugere uma diminuição da produção de calor e de dissipação de energia. Além disso, a diminuição da capacidade de síntese de lipídios a partir da  $^{14}\text{C}$ -glicose

reduziu o gasto energético, o que contribuiu para o aumento dos níveis de ATP tecidual.

A incubação do TAM em presença de diferentes doses de hSTC-1 não alterou a expressão da proteína UCP-1, no entanto, o ATP e outros nucleotídeos inibem o transporte de prótons catalisado por essa proteína desacopladora (BOUILLAUD et al., 2016). Desta forma o aumento de ATP celular levaria a UCP-1 a uma modificação de conformação que impediria a saída dos prótons e o retorno do gradiente eletroquímico como sugere Bouillaud e colaboradores (2016). Além disso, a diminuição no ciclo síntese de TAG/mobilização reduz a energia convertida em calor pelo desacoplamento mitochondrial mediado pela UCP-1, pois a presença dos ácidos graxos é importante, pois modifica a conformação dessa proteína facilitando a condução dos prótons pela UCP-1 (BOUILLAUD et al., 2016).

Podemos sugerir que a hSTC-1 está exerce um papel inibitório indireto à termogênese, pois com a diminuição na síntese de TG este hormônio diminui o aporte de ácidos graxos celulares, que servirão oxidados para a geração de calor e também diminui a ativação da UCP-1 (FESTUCCIA et al., 2011). Além da diminuição da ativação da UCP-1, a hSTC-1 também aumenta os níveis celulares de ATP que, como discutimos anteriormente, também inibe o transporte de  $H^+$  via UCP-1 (BOUILLAUD et al., 2016). Com o aumento do ATP e diminuição dos ácidos graxos, possivelmente temos uma queda na atividade termogênica no TAM em presença de hSTC-1.

Os efeitos metabólicos da STC-1 são tecido-específicos. Como observamos no presente trabalho, a incubação do TAB em presença de hSTC-1 aumentou a síntese *de novo* de lipídios, enquanto a mesma via foi inibida pela hSTC-1 nas mesmas condições experimentais no TAM. Apesar de serem chamados de tecido adiposo, o TAB e o TAM possuem diferenças anatômicas e fisiológicas importantes. Uma das mais importantes diferenças entre esses dois tecidos é a função: enquanto o TAB tem como função primária o

armazenamento de energia, o TAM dissipa energia em forma de calor (UNSER et al., 2015). A causa desse antagonismo de resposta ao hormônio hSTC-1 está nas diferentes linhagens que dão origem a cada um desses tecidos (UNSER et al., 2015). O TAM é originado da linhagem Myf5 que origina também os músculos. Muitas proteínas encontradas expressas no TAM são similares aquelas presentes no músculo e não no TAB, especialmente aquelas envolvidas na captação de ácidos graxos, no transporte intracelular de lipídios e na oxidação de ácidos graxos (CANNON; NEDERGAARD, 2008). Desta forma, comparar os efeitos do hormônio hSTC-1 entre os dois tecidos pode ser um equívoco, pois são muitas as particularidades metabólicas. Podemos sugerir que a STC-1 possa ser um hormônio envolvido na manutenção da capacidade energética uma vez que aumenta a síntese de lipídios no TAB (tecido de reserva) e diminui a produção de lipídios no TAM (tecido que usaria esse substrato para dissipar energia), mas aumenta a concentração de ATP. Outro dado que corrobora à hipótese da STC-1 como um hormônio envolvido na manutenção do ATP celular é encontrado no trabalho de Zhang e colaboradores (2000). Eles encontraram que as células Paju tratadas com STC-1 foram capazes de manter a síntese de ATP mesmo em ambiente hipóxico (ZHANG et al., 2000).

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1 No tecido adiposo branco a hSTC-1:

- Aumentou da incorporação do  $^{14}\text{C}$  da glicose em lipídios;
- Aumentou da incorporação do  $^{14}\text{C}$  da glicose em  $^{14}\text{CO}_2$ ;
- Não alterou significativamente a razão ADP/ATP celular;
- Não alterou significativamente a lipólise induzida pela adrenalina.

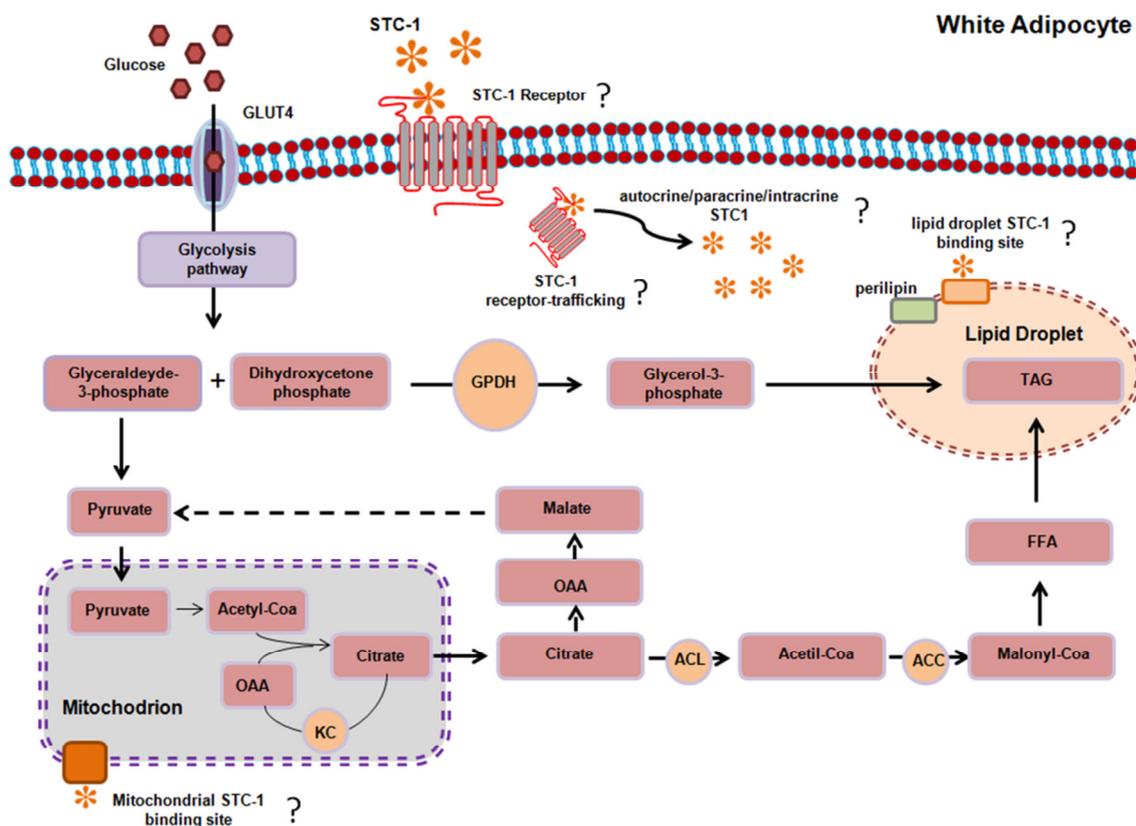


Figura 12: Representação esquemática das vias metabólicas influenciadas pela ação da hSTC-1 no tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos. A figura foi retirada do artigo 1 da tese publicado na revista Lipids. As linhas cheias representam as vias metabólicas reguladas pela hSTC-1. GLUT4-transportador de glicose 4; GPDH- glicerol-3-fosfato desidrogenase; OAA-

oxaloacetato; KC- ciclo de Krebs; ACL- ATP citrato liase; ACC- Acetil-CoA carboxilase ; FFA- ácidos graxos livres; TAG- triacilglicerol

## 6.2 No tecido adiposo marrom a hSTC-1:

- Reduziu a incorporação do  $^{14}\text{C}$  da glicose em lipídios;
- Não alterou significativamente a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -1-ácido palmítico e de  $^{14}\text{C}$ -glicose;
- Aumentou dos níveis de ATP, mas não alterou de forma significativa a razão ADP/ATP;
- Não alterou significativamente a expressão da proteína UCP-1.

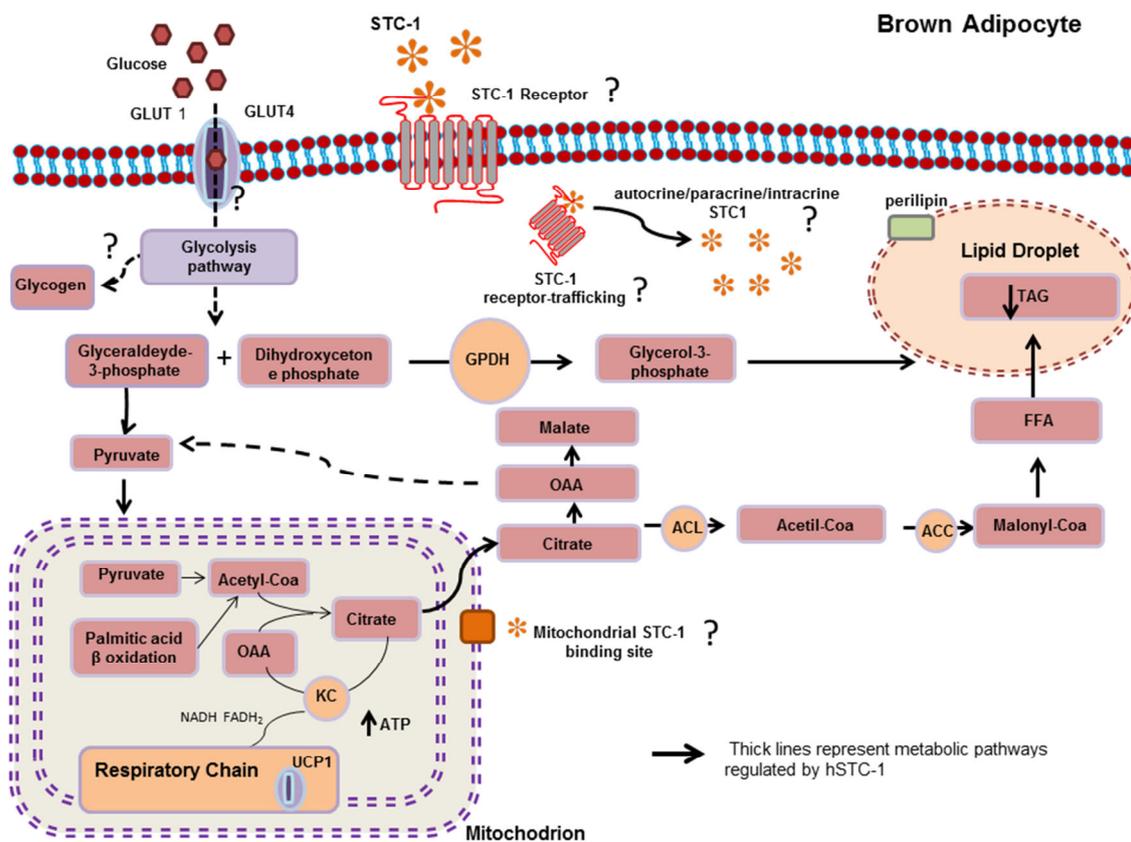


Figura 13: Representação esquemática das vias metabólicas influenciadas pela ação da hSTC-1 no tecido adiposo marrom de ratos. A figura foi submetida como Graphical Abstract do artigo 2 da tese enviado para a revista Biochimie. As linhas cheias representam as vias metabólicas reguladas pela hSTC-1.

GLUT4- transportador de glicose 4; GPDH- glicerol-3-fosfato desidrogenase;  
OAA- oxaloacetato; KC- ciclo de Krebs;UCP-1- proteína desacopladora 1; ACL-  
ATP citrato liase; ACC- Acetil-CoA carboxilase ; FFA- ácidos graxos livres;  
TAG- triacilglicerol

Concluindo, mesmo de maneira antagônica, a STC-1 parece ser um dos fatores hormonais que participam localmente do controle do metabolismo do tecido adiposo branco e marrom. Os experimentos *in vitro* desse estudo esclarecem, em parte, papel metabólico da STC-1, que apesar das diferenças interteciduais, teria um caráter anabólico de preservação de energia.

## 7. PERSPECTIVAS

Assim como a insulina, a STC-1 parece ter um caráter anabólico no TAB. Mas, apesar de estimular a síntese de lipídios, esse hormônio não atua impedindo a lipólise. Assim para confirmarmos o efeito da STC-1 no lipogênese *de novo* e na produção de G3P, vamos determinar a atividade das enzimas citrato liase e glicerol-3-fosfato desidrogenase, respectivamente.

A hSTC-1 estaria impedindo ou diminuindo a atividade termogênica do TAM? No presente estudo, o efeito da hSTC-1 no TAM foi determinado no estado basal do tecido. Para responder essa pergunta, em nossos estudos futuros, vamos determinar a influência do hormônio hSTC-1 na atividade termogênica do TAM. Para isso, vamos expor os animais ao frio e, assim, verificar os parâmetros como: expressão de GLUT1, expressão da UCP-1, expressão de enzimas envolvidas com a lipogênese *de novo* e a oxidação dos ácidos graxos.

Além disso, nos dois tecidos seria interessante analisar a concentração de AMPc celular e a expressão e atividade da proteína cinase A (PKA) para investigar a cascata de sinalização da STC-1 no TAM e no TAB.

## 8. REFERÊNCIAS

AHIMA, R. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **Obesity**, v. 14, n. August, 2006.

AMEMIYA, Y.; MARRA, L. E.; REYHANI, N.; YOUSON, J. H. Stanniocalcin from an ancient teleost: a monomeric form of the hormone and a possible extracorporeal distribution. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, p. 141–150, 2002.

ARGYROPOULOS, G.; HARPER, M. Uncoupling proteins and thermoregulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 2187–2198, 2002.

BARTELT, A.; BRUNS, O. T.; REIMER, R.; et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 200–205, 2011. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2297>>. .

BOUILLAUD, F.; ALVES-GUERRA, M. C.; RICQUIER, D. UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 10, p. 2443–2464, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.013>>. .

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 254, p. 248–254, 1976.

BRASAEMLE, D. L.; SUBRAMANIAN, V.; GARCIA, A.; MARCINKIEWICZ, A.; ROTHENBERG, A. Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 326, n. 1–2, p. 15–21, 2009.

BROWN, E. M. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 3, p. 333–343, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.006>>. .

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Developmental biology: Neither fat nor flesh.

**Nature**, v. 454, n. August, p. 947–948, 2008.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. A. N. Brown Adipose Tissue : Function and Physiological Significance. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 277–359, 2004.

CHANG, A. C.; CHA, J.; KOENTGEN, F.; REDDEL, R. R. The Murine Stanniocalcin 1 Gene Is Not Essential for Growth and Development. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 23, p. 10604–10610, 2005.

CHANG, A. C.; DOHERTY, J.; HUSCHTSCHA, L. I.; et al. STC1 expression is associated with tumor growth and metastasis in breast cancer. **Clinical Experimental Metastasis**, p. 15–27, 2015.

CHANG, A. C.; DUNHAM, M. A.; JEFFREY, K. J.; REDDEL, R. R. Molecular cloning and characterization of mouse stanniocalcin cDNA. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 7, n. 96, p. 2–4, 1996.

CHANG, A. C.; JANOSI, J.; HULSBEEK, M.; et al. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 112, p. 241–247, 1995.

CHANG, A. C.; JELLINEK, D. A.; REDDEL, R. R. Mammalian stanniocalcins and cancer. **Endocrinology**, p. 359–373, 2003.

CHANG, A. C. M.; HOOK, J.; LEMCKERT, F. A.; et al. The murine stanniocalcin 2 gene is a negative regulator of postnatal growth. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2403–2410, 2008.

CHANG, A. C.; REDDEL, R. R. Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human : Stanniocalcin 2. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 141, p. 95–99, 1998.

CHAVES, V. E.; FRASSON, D.; KAWASHITA, N. H. Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. **Biochimie**, v. 93, n. 10, p. 1631–1640, 2011. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.018>>. .

CHAVES, V. E.; FRASSON, D.; MARTINS-SANTOS, M. E.; et al. Fatty acid synthesis and generation of glycerol-3-phosphate in brown adipose tissue from

rats fed a cafeteria diet. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 86, n. 7, p. 416–423, 2008. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18641690](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18641690)>. .

COZER, A. G.; TRAPP, M.; VIEIRA MARQUES, C.; et al. Stanniocalcin 1 Enhances Carbon Flux from Glucose to Lipids in White Retroperitoneal Adipose Tissue in the Fed Rat. **Lipids**, v. 51, n. 11, 2016.

CYPESS, A.; LEHMAN, S.; WILLIAMS, G. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **National Institute of Health**, v. 360, n. 15, p. 1509–1517, 2009.

CYPESS, A. M.; CHEN, Y.; SZE, C.; et al. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 25, p. 10001–10005, 2012.

DALLNER, O. S.; CHERNOGUBOVA, E.; BROLINSON, K. A.; BENGTSSON, T. B3-Adrenergic Receptors Stimulate Glucose Uptake in Brown Adipocytes By Two Mechanisms Independently of Glucose Transporter 4 Translocation. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5730–5739, 2006.

DEOL, H. K.; VARGHESE, R.; WAGNER, G. F.; et al. Dynamic Regulation of Mouse Ovarian Stanniocalcin Expression during Gestation and Lactation \*. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3412–3421, 2000.

DIMATTIA, G. E.; VARGHESE, R.; WAGNER, G. F. Molecular cloning and characterization of stanniocalcin-related protein. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 146, n. 1–2, p. 137–140, 1998.

ELLARD, J. P.; MCCUDDEN, C. R.; TANEGA, C.; et al. The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 264, n. 1–2, p. 90–101, 2007.

FELDMANN, H. M.; GOLOZOUBOVA, V.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J.

Short Article UCP1 Ablation Induces Obesity and Abolishes Diet-Induced Thermogenesis in Mice Exempt from Thermal Stress by Living at Thermoneutrality. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 2, p. 203–209, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2008.12.014>>. .

FESTUCCIA, W. T.; BLANCHARD, P.; DESHAIES, Y. Control of brown adipose tissue glucose and lipid metabolism by PPAR  $\gamma$ . **Frontiers in Endocrinology**, v. 2, n. December, p. 1–6, 2011.

FILVAROFF, E. H.; GUILLET, S.; ZLOT, C.; et al. Stanniocalcin 1 Alters Muscle and Bone Structure and Function in Transgenic Mice. **Endocrinology**, v. 143, n. November, p. 3681–3690, 2002.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, 1957. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/226/1/497.short>>. .

FRASSON, D.; BOSCHINI, R. P.; CHAVES, V. E.; et al. The sympathetic nervous system regulates the three glycerol-3P generation pathways in white adipose tissue of fasted, diabetic and high-protein diet-fed rats. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 61, n. 10, p. 1473–1485, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2012.03.014>>. .

GAGLIARDI, A. D.; KUO, E. Y. W.; RAULIC, S.; et al. Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 6, p. 92–105, 2005.

GIRALT, M.; VILLARROYA, F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? **Endocrinology**, , n. C, p. 1–9, 2013.

GROVE, K.; FRIED, S.; GREENBERG, A.; XIAO, X.; CLEGG, D. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. **National Institute of Health**, v. 34, n. 6, p. 989–1000, 2010.

GU J. Characterization of stanniocalcin 1 binding and signaling in gill cells of Japanese eels. **Journal of Molecular Endocrinology**, p. 305–314, 2015.

GUERRA, C.; NAVARRO, P.; VALVERDE, A. M.; et al. Brown adipose tissue – specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p. 1205–1213, 2001.

GUERREIRO, P. M.; FUENTES, J.; POWER, D. M.; et al. Parathyroid hormone-related protein: a calcium regulatory factor in sea bream ( *Sparus aurata* L. ) larvae. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, p. 855–860, 2001.

HIRABARA, S. M.; SILVEIRA, L. R.; CAMARGO, L. F. T.; et al. Efeito Dos Ácidos Graxos No Desacoplamento Mitocondrial E Na Produção De Óxido Nítrico Durante a Contração Muscular – Uma Hipótese. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 15, n. 11, p. 73–80, 2007.

ISHIBASHI, K.; MIYAMOTO, K.; TAKETANI, Y.; et al. Molecular Cloning of a Second Human Stanniocalcin. **Biochemical and Biophysical Research**, v. 258, p. 252–258, 1998.

KAWASHITA, N. H.; FESTUCCIA, W. T.; BRITO, M. N.; et al. Glycerokinase activity in brown adipose tissue: a sympathetic regulation? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 4, p. R1185-90, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893624>\n<http://ajpregu.physiology.org/content/ajpregu/282/4/R1185.full.pdf>>. .

KOPECKÝ, J. A. N.; FLACHS, P.; BARDOVÁ, K.; et al. Modulation of Lipid Metabolism by Energy Status of Adipocytes Implications for Insulin Sensitivity. **Annual New York Academy of Sciences**, v. 967, p. 88–101, 2002.

LICHTENBELT, W. D. V. M.; VANHOMMERIG, J. W.; SMULDERS, N. M.; et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. **The New England Journal of Medicine**, 2009.

LU, M.; WAGNER, G. F.; RENFRO, J. L. Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 267, n. 5, p. R1356 LP-R1362, 1994. JOUR, . Disponível em:

<<http://ajpregu.physiology.org/content/267/5/R1356.abstract>>. .

LUO, C.; PISARSKA, M. D.; HSUEH, A. J. W. Identification of a Stanniocalcin Paralog , Stanniocalcin- 2 , in Fish and the Paracrine Actions of Stanniocalcin-2 in the Mammalian Ovary. **Endocrinology**, v. 146, n. November, p. 469–476, 2016.

MAUVAIS-JARVIS, F.; CLEGG, D. J.; HEVENER, A. L. The Role of Estrogens in Control of Energy Balance and Glucose Homeostasis. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. May, p. 309–338, 2016.

MCCUDDEN, C. R.; JAMES, K. A.; HASILO, C.; WAGNER, G. F. Characterization of Mammalian Stanniocalcin Receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 45249–45258, 2002.

MCCUDDEN, C. R.; KOGON, M. R.; DIMATTIA, G. E.; WAGNER, G. F. Novel expression of the stanniocalcin gene in fish. **Journal of Endocrinology**, v. 171, n. 1, p. 33–44, 2001.

MCCUDDEN, C. R.; MAJEWSKI, A.; CHAKRABARTI, S.; WAGNER, G. F. Co-localization of stanniocalcin-1 ligand and receptor in human breast carcinomas. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 213, n. 2, p. 167–172, 2004.

NA, S.; BORRIS, M.; SUNG, H.; et al. Biochimica et Biophysica Acta Stanniocalcin-2 ( STC2 ): A potential lung cancer biomarker promotes lung cancer metastasis and progression ☆. **BBA - Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 6, p. 668–676, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.11.002>>. .

NIELSEN, T. S.; JESSEN, N.; JØRGENSEN, J. O. L.; MØLLER, N.; LUND, S. Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 52, n. 3, 2014.

NIU, P. DE; OLSEN, H. S.; GENTZ, R.; WAGNER, G. F. Immunolocalization of stanniocalcin in human kidney. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 137, p. 155–159, 1998.

NIU, P. DE; RADMAN, D. P.; JAWORSKI, E. M.; et al. Development of a human

stanniocalcin radioimmunoassay: Serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 162, n. 1–2, p. 131–144, 2000.

OBREGON, M.-J. Adipose tissues and thyroid hormones. **Frontiers in physiology**, v. 5, n. December, p. 479, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4263094&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. .

OLSEN, H. S.; CEPEDA, M. A.; ZHANG, Q.; et al. Human stanniocalcin: A possible hormonal regulator of mineral metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. March, p. 1792–1796, 1996.

OWEN, O. E.; KALHAN, S. C.; HANSON, R. W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30409–30412, 2002.

PACIGA, M.; HIRVI, E. R.; JAMES, K.; WAGNER, G. F. Characterization of big stanniocalcin variants in mammalian adipocytes and adrenocortical cells. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 289, n. 2, p. E197-205, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741242>>. .

PACIGA, M.; MCCUDDEN, C. R.; LONDOS, C.; DIMATTIA, G. E.; WAGNER, G. F. Targeting of Big Stanniocalcin and Its Receptor to Lipid Storage Droplets of Ovarian Steroidogenic Cells \*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 49549–49554, 2003.

PALOU, M.; SÁNCHEZ, J.; PRIEGO, T.; et al. Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and refeeding. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 23–33, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.10.001>>. .

PORTER, R. K. A new look at UCP 1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 446–448, 2006.

POWER, M. L.; SCHULKIN, J. Review Article Sex differences in fat storage , fat metabolism , and the health risks from obesity : possible evolutionary origins. **British Journal of Nutrition**, p. 931–940, 2008.

PROENÇA, A. R. G.; SERTIÉ, R. A. L.; OLIVEIRA, A. C.; et al. New concepts in white adipose tissue physiology. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 3, p. 192–205, 2014.

RADMAN, D. P.; MCCUDDEN, C.; JAMES, K.; NEMETH, E. M.; WAGNER, G. F. Evidence for calcium-sensing receptor mediated stanniocalcin secretion in fish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 186, p. 111–119, 2002.

RESENDE, P. E. DE; KAISER, S.; PITTOL, V.; et al. Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 440–451, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.040>>.

SANTOS, M. P. DOS; FRANÇA, S. A. DE; SANTOS, J. T. F. DOS; et al. A low-protein, high-carbohydrate diet increases fatty acid uptake and reduces norepinephrine-induced lipolysis in rat retroperitoneal white adipose tissue. **Lipids**, v. 47, n. 3, p. 279–289, 2012.

SAZONOVA, O.; JAMES, K. A; MCCUDDEN, C. R.; et al. Stanniocalcin-1 secretion and receptor regulation in kidney cells. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 294, n. 4, p. F788-94, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18199603>>.

SCHEIN, V.; CARDOSO, J. C. R.; PINTO, P. I. S.; et al. Four stanniocalcin genes in teleost fish: Structure, phylogenetic analysis, tissue distribution and expression during hypercalcemic challenge. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, n. 2, p. 344–356, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.11.033>>.

SCHEIN, V.; KUCHARSKI, L. C.; GUERREIRO, P. M. G.; et al. Stanniocalcin 1 effects on the renal gluconeogenesis pathway in rat and fish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 414, p. 1–8, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível

em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.010>>. .

SERLACHIUS, M.; ANDERSSON, L. C. Upregulated expression of stanniocalcin-1 during adipogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 296, n. 2, p. 256–264, 2004.

SERLACHIUS, M.; ZHANG, K. Z.; ANDERSSON, L. C. Stanniocalcin in terminally differentiated mammalian cells. **Peptides**, v. 25, n. 10 SPEC. ISS., p. 1657–1662, 2004.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of Lipid Research**, v. 48, 2007.

SHEIKH-HAMAD, D. Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 298, n. 2, p. F248-54, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3774476&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. .

STICH, V.; HARANT, I.; GLISEZINSKI, I. DE; et al. Adipose tissue lipolysis and hormone-sensitive lipase expression during very-low-calorie diet in obese female identical twins. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 3, p. 739–744, 1997.

THOONEN, R.; HINDLE, A. G.; SCHERRER-CROSBIE, M. Brown adipose tissue: The heat is on the heart. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 310, n. 11, p. H1592-605, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084389>>. .

TORRES, I. L. S.; VASCONCELLOS, A. P.; SILVEIRA CUCCO, S. N.; DALMAZ, C. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 2, p. 241–244, 2001.

TURNER, J.; SAZONOVA, O.; WANG, H.; POZZI, A.; WAGNER, G. F. Induction of the renal stanniocalcin-1 gene in rodents by water deprivation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 328, n. 1–2, p. 8–15, 2010. Elsevier

Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.06.002>>. .

TURNER, J.; XIANG, F. L.; FENG, Q.; WAGNER, G. F. The renal stanniocalcin-1 gene is differentially regulated by hypertonicity and hypovolemia in the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 331, n. 1, p. 150–157, 2011. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.09.010>>. .

UNSER, A. M.; TIAN, Y.; XIE, Y. Opportunities and challenges in three-dimensional brown adipogenesis of stem cells. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 962–979, 2015. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.005>>. .

VARGHESE, R.; GAGLIARDI, A. D.; BIALEK, P. E.; et al. Overexpression of Human Stanniocalcin Affects Growth and Reproduction in Transgenic Mice. **Endocrinology**, v. 143, n. November, p. 868–876, 2002.

VARGHESE, R.; WONG, C. K. C.; DEOL, H.; WAGNER, G. F.; DIMATTIA, G. E. Comparative analysis of mammalian stanniocalcin genes. **Endocrinology**, v. 139, n. 11, p. 4714–4725, 1998.

VILLARROYA, J.; CEREIJO, R.; VILLARROYA, F. An endocrine role for brown adipose tissue? **American journal of Physiology. Endocrinology and metabolism**, 2013.

VIRTANEN, K. A. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism The rediscovery of BAT in adult humans using imaging. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 471–477, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2016.09.001>>. .

VIRTANEN, K.; LIDELL, M.; ORAVA, J.; et al. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. **The New England Journal of Medicine**, 2009.

VOSSSELMAN, M. J.; LICHTENBELT, W. D. V. M.; SCHRAUWEN, P. Molecular and Cellular Endocrinology Energy dissipation in brown adipose tissue : From mice to men. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 379, n. 1–2, p. 43–50, 2013. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.017>>. .

VOSSelman, M. J.; MARKEN LICHTENBELT, W. D. VAN; SCHRAUWEN, P. Energy dissipation in brown adipose tissue: From mice to men. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 379, n. 1–2, p. 43–50, 2013. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.017>>. .

WAGNER, G. F.; DIMATTIA, G. E.; DAVIE, J. R.; COPP, D. H.; FRIESEN, H. G. Molecular cloning and cDNA sequence analysis of coho salmon stanniocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 90, 1992.

WAGNER, G. F.; GELLERSEN, B.; FRIESEN, H. G. Primary culture of teleocalcin cells from rainbow trout corpuscles of Stannius: regulation of teleocalcin secretion by calcium. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 62, n. 1989, p. 31–39, 1989.

WAGNER, G. F.; GUIRAUDONT, C. C.; MILLIKENT, C.; COPPT, D. H. Immunological and biological evidence for a stanniocalcin-like hormone in human kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. March, p. 1871–1875, 1995.

WAGNER, G. F.; HAMPONG, M.; PARK, C. M.; COPP, D. H. Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius. **General and Comparative Endocrinology**, v. 63, n. 3, p. 481–491, 1986.

WAGNER, G. F.; JAWORSKI, E. Calcium regulates stanniocalcin mRNA levels in primary cultured rainbow trout corpuscles of Stannius. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 99, p. 315–322, 1994.

WAGNER, G. F.; MILLIKEN, C.; FRIESEN, H. G.; COPP, D. H. Studies on the regulation and characterization of plasma stanniocalcin in rainbow trout. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 79, n. 1–3, p. 129–138, 1991.

WANG, C. W. Lipid droplets, lipophagy, and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 8, p. 793–805, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.010>>. .

WANG, Y.; HUANG, L.; ABDELRAHIM, M.; CAI, Q.; TRUONG, A. Stanniocalcin-1 suppresses superoxide generation in macrophages through induction of mitochondrial UCP2. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. October, p. 981–988, 2009.

WU, S.; YOSHIKO, Y.; LUCA, F. DE. Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 5120–5127, 2006.

YEUNG, B. H. Y.; LAW, A. Y. S.; WONG, C. K. C. Evolution and roles of stanniocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 349, n. 2, p. 272–280, 2012. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.007>>. .

ZHANG, K. Z.; LINDSBERG, P. J.; TATLISUMAK, T.; et al. Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 7, p. 3637–42, 2000. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=16292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

ZINGARETTI, M. C.; CROSTA, F.; VITALI, A.; et al. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 9, p. 3113–3120, 2009. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/efetch.fcgi?dbfrom=pubmed&id=19417078&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/doi/10.1096/fj.09-133546>>. .

## 9. ANEXO

Figura 14: Efeito da hSTC-1 (0,386 pM) sobre a concentração de ATP no tecido adiposo branco de ratos. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM; n=5 animais.

