

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Efeitos dos hormônios peptídicos *Staniocalcina 1* e *Staniocalcina 2* sobre metabolismo da glicose em ratos

Dissertação de Mestrado

ALINE DA SILVA GONÇALVES

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientadora: Dra. Vanessa Schein

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Efeitos dos hormônios peptídicos *Staniocalcina 1* e *Staniocalcina 2* sobre metabolismo da glicose em mamíferos.

ALINE DA SILVA GONÇALVES

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia.

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientadora: Dra. Vanessa Schein

Porto Alegre, 2012

AGRADECIMENTOS

À professora Roselis Silveira Martins da Silva pela ajuda, paciência e conhecimento dedicados a mim nesse período;

À Vanessa Schein pelo incentivo para entrar nesse assunto desconhecido que é as Stanioalcinas;

Ao professor Luiz Carlos Kucharski pela paciência e por estar sempre à disposição para resolver qualquer problema;

À colega e amiga Camila Ludke Rossetti que além de ter sido essencial na execução desse trabalho não poupou tempo e zelo comigo sendo um suporte emocional importantíssimo nesse período;

Aos demais colegas do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada pela divertida e eficiente companhia diária nos experimentos;

Aos colegas de mestrado que sempre estiveram com a porta de seus laboratórios aberta para que fosse possível a realização dos experimentos, especialmente a colega e amiga Patrícia Martiny pela ajuda e apoio constantes;

Aos colegas, professores, técnicos e funcionários do Departamento de Fisiologia;

Aos meus pais, Maria e Marcelo e à minha irmã Vanessa por nunca deixarem de acreditar em mim;

Às minhas amigas Bruna e Aline por estarem comigo em todos os momentos me apoiando;

A todas as pessoas que de alguma forma estiveram comigo nesse momento;

À CAPES pelo auxílio financeiro;

À UFRGS pela minha formação e possibilidade de realizar esse trabalho.

OBRIGADA

RESUMO

As Staniocalcinas (STC1 e STC2) são hormônios glicoproteicos identificados primeiramente em peixes teleósteos e possuem a função de diminuir os níveis plasmáticos de Ca^{+2} sendo também chamados de hipocalcinas. Em vertebrados superiores, esses hormônios estão expressos em uma variedade de tecidos. As STC parecem ter, nesses organismos, uma função autócrina/parácrina ao contrário da ação endócrina clássica observada nos peixes. Observou-se, dentre outras funções metabólicas, efeitos importantes desses hormônios na função mitocondrial e na via gliconeogênica. Esse estudo se propôs a avaliar a influência dos hormônios STC1 e STC2 no metabolismo da glicose no músculo e fígado de ratos com o objetivo de conhecer os efeitos no metabolismo intermediário dessas moléculas.

No presente estudo nenhuma das STCs alterou a captação de glicose no músculo e no fígado. No tecido hepático, os hormônios STC1 e STC2 mostraram uma ação inibitória sobre a oxidação de glicose. A STC1 estimulou a síntese de lipídios e aumentou a razão ADP/ATP e não teve influência na atividade da enzima piruvato cinase e síntese de glicogênio. A STC2 aumentou a atividade da enzima piruvato cinase e a razão ADP/ATP, porém não mostrou influência na síntese de lipídios e de glicogênio.

No tecido muscular a STC1 e a STC2 aumentaram a síntese de glicogênio. A STC1 diminuiu a atividade da piruvato cinase e aumentou a síntese de lipídios. Esse hormônio não alterou a oxidação de glicose e a razão ADP/ATP. A STC2 diminuiu a oxidação de glicose e estimulou a atividade da piruvato cinase e diminuiu a oxidação da glicose. A STC2 não mostrou efeito na síntese de lipídios e na razão ADP/ATP.

Esse trabalho demonstra que as STCs possuem um importante papel na regulação do metabolismo intermediário.

Palavras - chaves: STC1; STC2; metabolismo da glicose; músculo; fígado

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – monofosfato cíclico de adenosina

ATP – adenosina trifosfato

CAL- calcitonina

CS- Corpúsculo de Stannius

GLUT – transportador de glicose

Km – constante de dissociação enzimática

PEP –fosfoenolpiruvato

PK – piruvato cinase

PKA – proteína cinase A

STC- staniocalcina

TCA – ácido tricarbóxico

UDP- uridina difosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Vias bioquímicas de transferência e de armazenamento de energia oriunda da glicose.

Figura 1.2 : À esquerda o Professor H. Stannius que descobriu a glândula Corpúsculo de Stannius (CS) em 1839. À direita uma representação da localização do CS em peixes.

Figura 4.1A: Captação de 1-[¹⁴C]-2-desóxi-D-glicose no fígado de *Rattus norvegicus* em diferentes doses de STC1 ou de STC2.

Figura 4.1B: Captação de 1-[¹⁴C]-2-desóxi-D-glicose no músculo de *Rattus norvegicus* em diferentes doses de STC1 ou de STC2.

Figura 4.2A: Oxidação de[U-¹⁴C]- glicose no fígado de *Rattus norvegicus* em presença de diferentes doses de STC1 ou de STC2.

Figura 4.2B: Oxidação de [U-¹⁴C] glicose no músculo de *Rattus norvegicus* em presença de diferentes doses de STC1 ou de STC2.

Figura 4.3A: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL e 0,1ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a atividade da enzima piruvato cinase no fígado de *Rattus norvegicus*.

Figura 4.3B: Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a atividade da enzima piruvato cinase no músculo de *Rattus norvegicus*.

Figura 4.4A: Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de [U-¹⁴C]glicose em ¹⁴C glicogênio no fígado de *Rattus norvegicus*

Figura 4.4B: Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de [U-¹⁴C]glicose em ¹⁴C glicogênio no músculo de *Rattus norvegicus*.

Figura 4.5A: Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de [U-¹⁴C]glicose em ¹⁴C lipídios totais no fígado de *Rattus norvegicus*.

Figura 4.5B: Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de [U-¹⁴C]glicose em ¹⁴C lipídios totais no músculo de *Rattus norvegicus*.

Figura 4.6A: Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a razão ADP/ATP no fígado de *Rattus norvegicus*.

Figura 4.6B: Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a razão ADP/ATP no músculo de *Rattus norvegicus*.

Figura 6.1: Ação dos hormônios peptídicos STC1 e STC2 no metabolismo da glicose do tecido hepático de *Rattus norvegicus*.

Figura 6.2: Ação dos hormônios peptídicos STC1 e STC2 no metabolismo da glicose do tecido muscular de *Rattus norvegicus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
Metabolismo da Glicose.....	1
Stanniocalcinas (STCs).....	5
Funções Biológicas das STC1 e STC2 em mamíferos.....	10
Evidências do papel das STCs sobre o metabolismo intermediário em mamíferos.....	12
2. OBJETIVO GERAL	15
Objetivos Específicos.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
Animais.....	16
Procedimentos Experimentais	16
Captação de 1-[¹⁴ C]2-desóxi-D-Glicose (2-DG).....	17
Oxidação de Glicose.....	18
Síntese de Glicogênio.....	19
Síntese de Lipídios Totais.....	20
Determinação da Atividade da Enzima Piruvato Cinase (PK) (EC 2.7.1.40)	20
Determinação ADP/ATP	21
4. RESULTADOS.....	24
4.1 Estudo “ <i>in vitro</i> ” da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de 2DG no músculo e no fígado de <i>Rattus norvegicus</i>	24
4.2 Estudo “ <i>in vitro</i> ” da ação de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre incorporação do ¹⁴ C da glicose em ¹⁴ CO ₂ no fígado e no músculo de <i>Rattus norvegicus</i>	25
4.3 Estudo “ <i>in vitro</i> ” da ação de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a atividade da enzima piruvato cinase(PK) no fígado e no músculo de <i>Rattus norvegicus</i>	27
4.4 Estudo “ <i>in vitro</i> ” da ação de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre incorporação do ¹⁴ C da glicose em ¹⁴ C glicogênio no fígado e no músculo de <i>Rattus norvegicus</i>	29
4.5 Estudo “ <i>in vitro</i> ” da ação de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de ¹⁴ C glicose em ¹⁴ C lipídios totais no fígado e no músculo de <i>Rattus norvegicus</i>	31
4.6 Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a relação ADP/ATP no fígado e no músculo de <i>Rattus norvegicus</i>	33
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1.INTRODUÇÃO

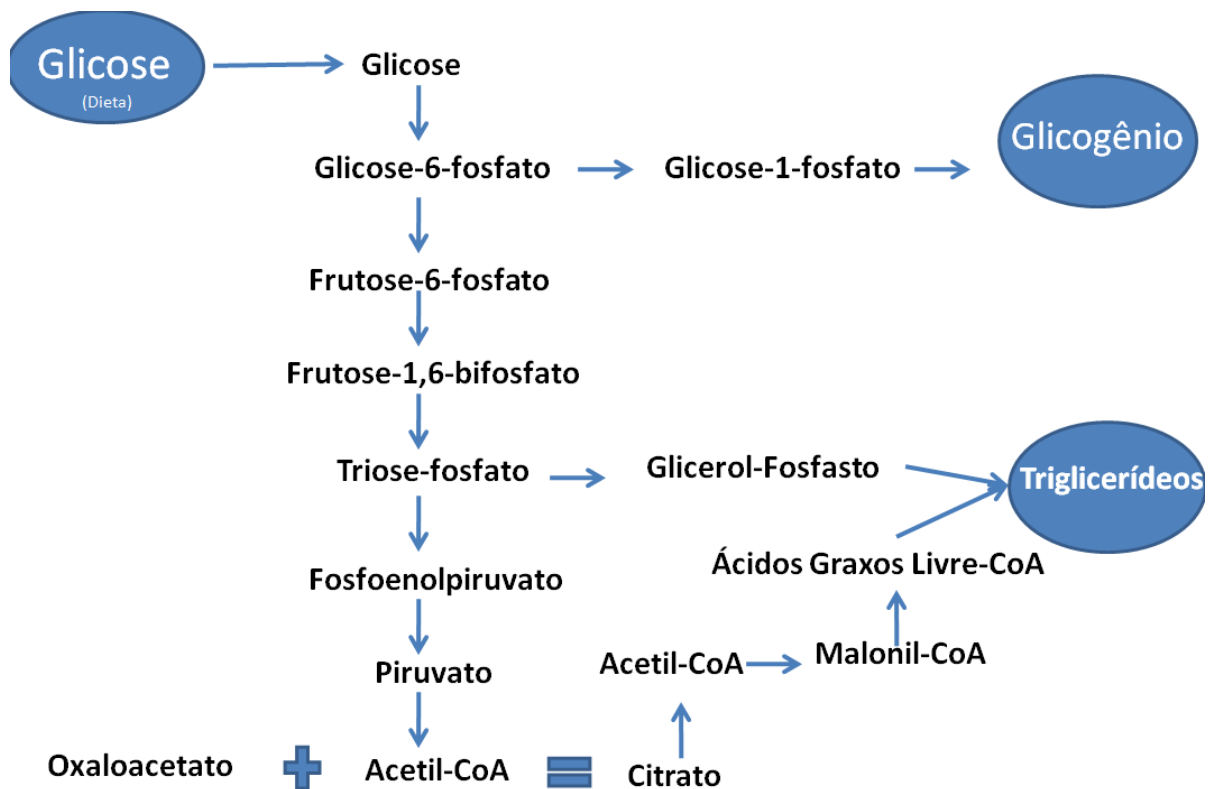
Metabolismo da Glicose

A glicose é a maior fonte de energia celular dos mamíferos. Além de ser um substrato energético fundamental, essa molécula é uma fonte de carbono essencial para a síntese de outros compostos. Desta forma, faz-se necessário que a concentração desse substrato seja estritamente mantida (Smith, Marks *et al.*, 2007). Vários fatores são importantes para que os níveis de glicose circulante sejam mantidos, entre eles, a concentração de carboidrato consumida na dieta e que é absorvida no intestino delgado, a utilização de glicose pelos tecidos periféricos e a remoção e liberação da glicose pelo fígado (Nordlie, Foster *et al.*, 1999). O fígado é o principal órgão mantenedor da homeostase da glicose no organismo, pois ele é o responsável pelo balanço entre captação e estocagem de glicose via glicogênese e liberação de glicose para a corrente sanguínea via glicogenólise e gliconeogênese (Nordlie, Foster *et al.*, 1999).

A captação de glicose pelas células é tecido específica; no fígado, a glicose entra nas células através do transportador GLUT2 por difusão facilitada. O Km elevado desse transportador e sua alta concentração na membrana dos hepatócitos conferem a esse tecido uma alta eficiência em captar a glicose circulante. O transporte de glicose pela membrana dos hepatócitos pode, por exemplo, ser regulado pelas concentrações extra e intracelulares de glicose e pelas concentrações de ATP intracelulares (Aires, 2008). Na célula muscular a captação de glicose também é feita por difusão facilitada, porém o transportador nessas células, o GLUT4, é sensível a insulina, um dos principais hormônios responsáveis pela

homeostase da glicose. Nas células musculares, bem como nas adiposas, o transporte da glicose para dentro da célula é um passo limitante para a utilização desse substrato (Aires, 2008).

Após a glicose ser transportada para o meio intracelular ela pode seguir diversos destinos (Figura 1.1). A principal via de direcionamento da glicose é a oxidação dessa molécula através da via glicolítica (Smith, Marks *et al.*, 2007).



Adaptado de (Berne, Levy *et al.*, 2004)

Figura 1.1: Vias bioquímicas de transferência e de armazenamento de energia oriunda da glicose.

A glicólise, primeira etapa da via glicolítica, é uma das principais rotas para produção de ATP celular. Resumidamente, essa via compreende a oxidação da glicose a piruvato no citossol da célula na presença ou não de oxigênio. Na segunda etapa da via glicolítica, o piruvato é oxidado a CO₂ no chamado ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na mitocôndria. O resultado dessa oxidação são seis moléculas de CO₂, seis moléculas de água e energia

armazenada na forma de ATP (Salway, 2009). A glicólise se inicia com a transferência de um grupamento fosfato do ATP para a glicose depois de sua entrada na célula pela enzima hexocinase cuja isoforma é tecido específica. A fosforilação dessa molécula impede que a glicose seja transportada para fora da célula através da membrana celular (Smith, Marks *et al.*, 2007).

A partir dessa primeira reação desenrola-se uma sequência de reações enzimáticas (fosforilações) até a última reação da glicólise que é a fosforilação do fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, catalisada pela enzima piruvato cinase. A enzima piruvato cinase muscular possui sítios alostéricos sendo ativadas por frutose 1,6 bifosfato e inibida por ATP, ácidos graxos e acetil coA. O tecido hepático, por sua vez, tem sua isoforma da piruvato cinase controlada por alguns efetores alostéricos como o ATP que diminui a atividade dessa enzima (Smith, Marks *et al.*, 2007). O piruvato é oxidado a acetil-CoA e entra no ciclo do TCA, conforme dito anteriormente, sendo assim completamente oxidado gerando ATP. Além dessa principal rota seguida pela glicose quando entra na célula existem dois outros caminhos que essa molécula pode seguir; a escolha dependerá do estado energético celular. A glicose depois de fosforilada pode seguir a via da síntese de glicogênio ou o piruvato originado pela glicólise pode servir de fornecedor de carbonos para a biossíntese de outras moléculas como, por exemplo, a síntese de ácidos graxos (Figura 1.1) (Berne, Levy *et al.*, 2004).

Resumindo, se a célula necessitar de energia e houver glicose disponível essa glicose será completamente oxidada na via glicolítica resultando na formação de ATP. Porém depois das refeições quando há um excesso de glicose, esse substrato é direcionado para a via de síntese de glicogênio, processo chamado de glicogênese (Salway, 2009). Nesta via a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato que é convertida em glicose-1-fosfato pela ação da enzima fosfoglicomutase em uma reação reversível. A glicose-1- fosfato é convertida em uridina difosfato (UDP) glicose que sofre a ação da enzima glicogênio sintase para a biossíntese de

glicogênio (Smith, Marks *et al.*, 2007). O fígado e os músculos esqueléticos são os principais órgãos que servem como depósito de glicogênio. Na maioria dos tecidos em que o glicogênio é armazenado, os estoques desse substrato são utilizados como uma fonte emergencial de substratos energéticos. No fígado, o papel do glicogênio é diferente daquele que envolve o músculo esquelético e os outros tecidos. O glicogênio hepático é a fonte imediata de glicose para que sejam mantidos seus níveis plasmáticos (Smith, Marks *et al.*, 2007).

O fígado e o tecido adiposo são os órgãos com a maior capacidade de sintetizar triacilgliceróis (Salway, 2009). O músculo esquelético utiliza a oxidação de lipídios para garantir a maior parte da sua energia (Eaton *et al.*, 1961). No músculo esquelético a maior reserva de lipídios está presente nos adipócitos que se encontram entre as fibras musculares. A via para a síntese de ácidos graxos inicia-se com a conversão de glicose em acetil-CoA citossólico. O primeiro passo é a conversão da glicose em piruvato através da glicólise. O piruvato é transformado dentro da mitocôndria em acetil-CoA pela ação da piruvato desidrogenase e em oxaloacetato pela ação da piruvato carboxilase. O oxaloacetato se condensa com o acetil-CoA formando o citrato, que tem habilidade de sair da mitocôndria e por meio da ação da enzima citossólica citratoliase e formar novamente oxaloacetato e acetil-CoA. O acetil-CoA citossólico é convertido a malonil-CoA. Cada molécula de malonil-CoA doa dois carbonos que são adicionados sequencialmente à cadeia de ácido graxo em formação pela ação da enzima ácido-graxo sintase. Essa sequência de reações é repetida até que a cadeia tenha 16 carbonos de comprimento. Ao chegar a esse comprimento a molécula passa por uma hidrólise e o palmitato é liberado. O palmitato é alongado e dessaturado para a produção de uma série de ácidos graxos (Smith, Marks *et al.*, 2007). Os ácidos graxos têm dois destinos celulares principais. O primeiro é sua conversão em triacilgliceróis com função de estoque energético e o segundo é ser incorporado aos componentes fosfolipídios de membrana (Nelson e Cox, 2011). Os triacilgliceróis são formados a partir de acil graxos CoA

e glicerol-3-fosfato. As acil-CoA sintetases formam os acil graxos CoA a partir dos ácidos graxos enquanto o glicerol-3-fosfato é derivado principalmente da ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase citossólica sobre o di-hidroxiacetona-fosfato (Nelson e Cox, 2011).

Staniocalcinas (STCs)

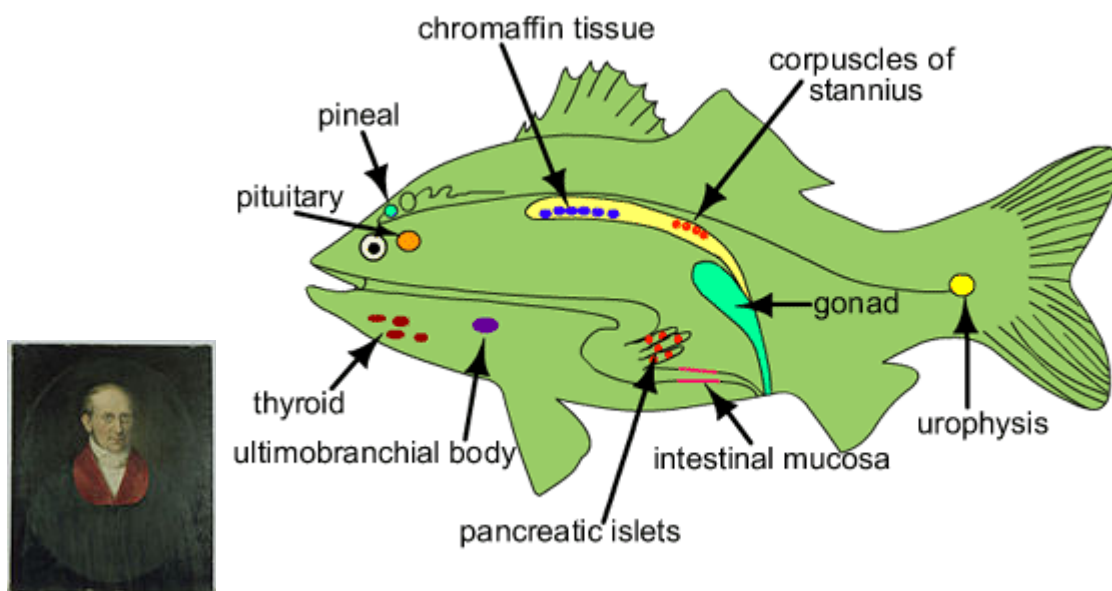
A homeostasia do cálcio é um processo biológico essencial à vida, pois este íon tem papel importante em diferentes mecanismos fisiológicos de vertebrados. Ao longo da evolução, um intrincado sistema, composto por sensores e hormônios, foi desenvolvido para a manutenção da homeostasia do cálcio em vertebrados. Os níveis do íon cálcio são mantidas dentro de limites específicos, pois distúrbios nas concentrações intra e extracelulares afetam funções como a geração e manutenção de potenciais de ação e os processos de divisão celular (Berne, Levy *et al.*, 2004).

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: hormônio da paratireoide (PTH), 1,25-di-hidroxicolecalciferol (1,25-(OH)₂D₃) e a proteína relacionada ao hormônio da paratireoide (PTHrP), 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. 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)-D₃, aumentando a concentração plasmática de cálcio (Guerreiro, Fuentes *et al.*, 2001; Berne, Levy *et al.*, 2004).

A proteína PTHrP foi descoberta em associação com certos tipos de câncer que causam elevações nos níveis de Ca^{+2} plasmático (síndrome denominada *humoral hypercalcemia malignancy* ou HHM). 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, Fuentes *et al.*, 2001). No entanto, estudos recentes levaram à descoberta de outros membros dessa família de proteínas, o que levanta novas questões sobre as funções e os possíveis mecanismos de atuação dessas moléculas. Um exemplo recente é a descoberta das Stanniocalcinas, principal fator hipocalcemizante que é indispensável à vida dos peixes (Amemiya, Marra *et al.*, 2002).

A Stanniocalcina (STC), também chamada de hipocalcina ou teleocalcina, é um hormônio glicoproteico originalmente encontrado em peixes teleósteos e pode ser considerado o primeiro hormônio anti-hipercalcêmico dos vertebrados (Wagner, Hampong *et al.*, 1986; Wagner, Gellersen *et al.*, 1989; Wagner, Dimattia *et al.*, 1992). Nestes peixes é secretada pelo Corpúsculo de Stannius (CS) (Figura 1.2), glândula endócrina que se localiza na superfície renal ventral dos peixes, regulando a homeostase cálcio/fosfato. A STC possui funções semelhantes à CAL (Wagner, Dimattia *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 classes de vertebrados. Enquanto que 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, Dimattia *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. Este hormônio restabelece a normocalcemia por meio de três efeitos regulatórios principais: inibindo a absorção de cálcio através do epitélio intestinal e a captação de cálcio ambiental pelas brânquias e estimulando a reabsorção renal de fosfato, que tem a função de quelar o excesso de Ca^{+2} (Wagner, Hampong *et al.*, 1986; Lu, Wagner *et al.*, 1994; Varghese, Wong *et al.*, 1998; Yeung, Law *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 mRNA da STC (Wagner e Jaworski, 1994; Yeung, Law *et al.*, 2012). Os peixes possuem receptores sensíveis ao cálcio que desencadeiam os sinais para a resposta fisiológica às flutuações nas concentrações desse íon (Radman, Mccudden *et al.*, 2002). Estudos recentes propõem que as STCs também teriam um papel regulador sobre a concentração de outros íons além do Ca^{+2} , como o Na^{+} e o Cl^{-} (Yeung, Law *et al.*, 2012).



Adaptado de www.vet.ohio-state.edu

Figura 1.2 : À esquerda o Professor H. Stannius que descobriu a glândula Corpúsculo de Stannius (CS) em 1839.

À direita uma representação da localização do CS em peixes (Serlachius, 2004).

Recentemente, em nosso laboratório, estudos realizados juntamente com o laboratório do Dr. Adelino Canário (Universidade do Algarve) demonstraram que a STC A de peixe aumenta a incorporação de ^{14}C -glutamina em glicose no rim do peixe teleósteo *Dicentrarchus labrax*. Entretanto, a STC B de peixe diminuiu significativamente a formação de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -lactato nos rins dessa mesma espécie (trabalho submetido).

Nos mamíferos não se conhece nenhuma estrutura que possa ser comparada ao CS, assim, acreditava-se que a presença e a função da STC tivessem se perdido durante a evolução. Porém, existem exemplos, entre as diversas classes de vertebrados, que demonstram que nem sempre os hormônios são secretados por glândulas endócrinas específicas. Um estudo imunocitoquímico, utilizando anticorpos de STC de salmão, encontrou no rim humano proteínas semelhantes à STC (Wagner, Guiraudon *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, Guiraudon *et al.*, 1995; Varghese, Wong *et al.*, 1998). No mesmo ano foram clonados o cDNA de STC com alta homologia com o hormônio dos peixes (Chang, Janosi *et al.*, 1995; Olsen, Cepeda *et al.*, 1996) e, enquanto que nos peixes essa proteína era sintetizada em um órgão específico, em tecidos humanos diversos estudos constataram que a STC estava amplamente expressa, sendo o mRNA desse peptídeo expresso nos ovários, nos rins, no pulmão, no fígado, na próstata, no coração, na tireóide e no músculo (Chang, Janosi *et al.*, 1995; Chang, Dunham *et al.*, 1996; Radman, Mccudden *et al.*, 2002). Entretanto, o nível de STC nestes órgãos é cerca de 100 vezes menor do que no CS. Em peixes, ainda é desconhecida uma ação parácrina das STCs porém elas são expressas em testículos, rins e ovários (Serlachius, 2004).

A comprovação da existência do cDNA de STC em diferentes tecidos de camundongos (Chang, Dunham *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 são mantidas, 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 e Reddel, 1998; De Niu, Olsen *et al.*, 1998; Varghese, Wong *et al.*, 1998).

Em peixes, estudos para identificar a expressão da proteína da STC em outros tecidos foram realizados por diversos pesquisadores. A surpresa foi que eles encontraram essa proteína em diversos tecidos como: brânquias, gônadas, coração, músculo e intestino. Esse interessante achado sugere que além da função já bem estabelecida de controle dos níveis de cálcio, a STC tenha em peixes, também, funções locais nesses tecidos, como provavelmente, ocorre com a STC humana, pois em situações fisiológicas essa proteína está presente no plasma de mamíferos apenas durante a gravidez (Varghese, Wong *et al.*, 1998; Deol, Varghese *et al.*, 2000; Yeung, Law *et al.*, 2012).

A identificação das células-alvo da STC ainda é difícil pela falta de informações acerca 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, Wagner *et al.*, 1994; Yeung, Law *et al.*, 2012).

Na maioria dos peixes e em todos os mamíferos, a STC1 (posteriormente houve a descoberta de um homólogo das proteínas tanto de peixe quanto de mamíferos que se denominou STC2) 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, Dimattia *et al.*, 1992; Olsen, Cepeda *et al.*, 1996; Varghese, Wong *et al.*, 1998; Chang, Jellinek *et al.*, 2003).

Dois anos após a clonagem do cDNA da STC humana, diferentes grupos 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 STC1 e a segunda proteína homologa às duas primeiras foi chamada de STC2. Uma análise da expressão da proteína da STC2 em diversos tecidos de humanos e camundongos mostrou o mesmo padrão de expressão variado da STC 1 (Chang e Reddel, 1998; Dimattia, Varghese *et al.*, 1998; Luo, Pisarska *et al.*, 2005). Apesar da STC2 mostrar apenas 30% de identidade na sequência de aminoácidos da STC1 humana, os limites 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 também clonaram a STC2 de peixes (Luo, Pisarska *et al.*, 2005). O RNAm da STC2 de peixes e de mamíferos, assim como a STC1, também é expresso em diversos tecidos de peixes (Dimattia, Varghese *et al.*, 1998). Em mamíferos, tecidos como o pâncreas, o baço, os rins e o músculo esquelético possuem uma marcante expressão do RNAm da STC2. Em situações fisiológicas, ainda não existem evidências de que essa proteína seja encontrada no plasma, tanto de peixes quanto de mamíferos.

Funções Biológicas das STC1 e STC2 em mamíferos

Os primeiros estudos que investigaram a funcionalidade dos hormônios STC1 e STC2 em mamíferos utilizaram ratos transgênicos que super expressavam ou eram *knockout* (animais que perdem a função de determinado gene) 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 STC1 não mostram alterações no fenótipo e aqueles que não expressavam a proteína STC2 mantinham os efeitos inibitórios do crescimento vistos na super expressão dessa molécula(Filvaroff, Guillet *et al.*, 2002; Varghese, Gagliardi *et al.*, 2002; Chang, Cha *et al.*, 2005; Gagliardi, Kuo *et al.*, 2005; Chang, Hook *et al.*, 2008).

Além de efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento dos organismos ainda existem evidências da importância das STC1 na regulação da homeostase do cálcio e do fosfato em mamíferos (Olsen, Cepeda *et al.*, 1996; Zhang, Lindsberg *et al.*, 2000). Zhang e colaboradores (2000) constataram que a STC1 aumenta a captação celular de fosfato inorgânico. Os autores também demonstraram que a STC1 diminuiu o dano neuronal causado pelo influxo de cálcio que medeia à toxicidade durante um processo isquêmico em ratos. A idéia de uma relação funcional entre a STC1 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, Law *et al.*, 2012). Estudos com animais mostraram o envolvimento da STC1 com a homeostase hídrica nos rins(Turner, Sazonova *et al.*, 2010; Turner, Xiang *et al.*, 2011).

Além disso, Law e colaboradores confirmaram o papel da STC1 no controle dos fluidos extracelulares quando relacionaram a liberação do hormônio arginina vasopressina com o aumento expressão de STC1 em ratos e camundongos (Law, Wong *et al.*, 2012).

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 STC2 no controle do cálcio e do fosfato. Alguns autores postulam que talvez os dois hormônios tenham funções biológicas complementares (Ishibashi, Miyamoto *et al.*, 1998).

A STC1 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, Wong *et al.*, 1998).

Apesar de muitas funções, principalmente do hormônio STC1, já terem sido relatadas, atualmente os tópicos de maior estudo têm sido o envolvimento desses hormônios nos processos inflamatórios e carcinogênicos (Ishibashi e Imai, 2002; Chang, Jellinek *et al.*, 2003).

Em um trabalho de revisão, Chang e colaboradores (2003) mostraram que os níveis de expressão da STC1 e STC2 estão elevados na maioria dos tipos de câncer humano. Esses dois hormônios também têm sido relacionados aos processos de angiogênese, de proliferação celular e de apoptose. Fatores como o VEGF estimulam a expressão da STC1. A STC2 foi relacionada com o aumento de invasão endotelial em tumores (Yeung, Law *et al.*, 2012). 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 STC1 possui ambos os efeitos (Zhang, Lindsberg *et al.*, 2000; Wu, Yoshiko *et al.*, 2006). Essa variação dos resultados não é exclusiva da STC1, outro exemplo similar importante é o fator de transcrição NFκB que dependendo do estresse que a célula é submetida varia entre efeitos pró ou anti apoptóticos (Ito, Walker *et al.*, 2004).

Evidências do papel das STCs sobre o metabolismo intermediário em mamíferos

Poucos trabalhos na literatura consultada demonstram o papel da STC1 e da STC2 no controle do metabolismo intermediário. Camundongos transgênicos que super expressavam STC1 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, Guillet *et al.*, 2002). A STC1 é responsável também por um aumento no tamanho das mitocôndrias sem prejudicar a integridade dessas organelas (Amemiya, Marra *et al.*, 2002; Filvaroff, Guillet *et al.*, 2002; McCudden, James *et al.*, 2002; Ellard, McCudden *et al.*, 2007). McCudden e colaboradores (2002) investigaram a ligação da STC1 ao receptor em membranas de hepatócitos e de células renais. Eles demonstraram a ligação do hormônio STC1 na membrana plasmática e na membrana mitocondrial de hepatócitos, sendo que 90% do hormônio foram localizados 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. Na literatura, diversos trabalhos sugerem evidências da existência de proteínas na superfície celular que têm afinidade pela STC 1 e funcionam como receptores para este hormônio. Não é bem compreendido ainda, se a STC 1 quando secretada liga-se a receptores na membrana plasmática e dispara cascatas de sinalização intracelulares ou se ela sofre endocitose e passa então a atuar dentro da célula. A possibilidade de que ambas alternativas possam ocorrer não é descartada. Outra hipótese seria a presença de diferentes receptores que possuam afinidade à STC 1 e cada receptor estaria ligado as diferentes respostas fisiológicas do hormônio em acordo com sua multifuncionalidade. Apesar de todas as evidências, até hoje, nenhum trabalho demonstrou experimentalmente qual é ou quais são os receptor (es) de STC 1. Em 2002, McCudden e colaboradores observaram, *in situ*, ligação de alta afinidade de STC1-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 STC1-AP, mais especificamente na membrana interna da mitocôndria e verificaram que a essa ligação estimulava o metabolismo

mitocondrial e a transferência de elétrons. Ellard e colaboradores (2007) demonstraram que a ligação STC 1 aos receptores mitocôndrias pode ser desfeita pela adição de ATP. A exposição de frações mitocondriais de hepatócitos e de células musculares à STC1 aumentou o consumo de oxigênio e a concentração de cálcio mitocondrial e diminuiu a razão ADP:O, que indica uma produção menos eficiente de ATP. Além disso, a STC1 aumentou a respiração celular de hepatócitos e de células musculares (Ellard, Mccudden *et al.*, 2007). O aumento no consumo de oxigênio, em conjunto com uma redução dos níveis de ATP, mostra o papel da STC1 na fosforilação oxidativa (Mccudden, James *et al.*, 2002; Ellard, Mccudden *et al.*, 2007). Esses trabalhos contribuem para a melhor compreensão acerca do papel metabólico da STC1.

Serlachius e Andersson (2004) observaram aumento na expressão da STC1 em adipócitos durante seu estágio final de maturação. Os autores relacionaram a presença da SCT1 com a resistência dessas células à apoptose e eles sugerem que a STC1 esteja envolvida com a homeostase do tecido adiposo.

Dados referentes a uma possível ação da STC2 sobre o metabolismo intermediário de mamíferos ainda são escassos. O pâncreas é o maior sítio produtor de STC2 em mamíferos. Moore e colaboradores (1999), utilizando a técnica de imuno-histoquímica, demonstraram que a STC2 se expressa no pâncreas e sugeriram que a localização da STC2 nas células alfa pancreáticas estaria relacionada ao possível papel desse hormônio sobre o metabolismo da glicose em mamíferos. (Moore, Kuestner *et al.*, 1999)

Resultados preliminares em nosso laboratório demonstram que a STC1 reduziu a capacidade de incorporação de ¹⁴C-glutamina em glicose no túbulo proximal renal (segmento 1, 2 e 3) de rato. Esse hormônio também diminuiu a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) no túbulo proximal renal de rato. Em contraste, a STC 1 aumentou significativamente os níveis de RNAm da PEPCK nesse órgão. Esses resultados sugerem o envolvimento da STC 1 na regulação da homeostase da glicose em ratos.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi de investigar o efeito de diferentes doses dos hormônios STC1 e STC2 (humanas) sobre o metabolismo da glicose em *Rattus norvegicus* com o propósito de demonstrar o efeito metabólico desses hormônios.

Objetivos Específicos

Determinar no fígado e no músculo gastrocnêmio de *Rattus norvegicus* os efeitos de diferentes doses das STC1 e STC2 (humanas) sobre a:

- a) Captação de 2-desóxi-glicose;
- b) Oxidação de ^{14}C glicose;
- c) Atividade da enzima piruvato cinase;
- d) Síntese de ^{14}C glicogênio;
- e) Síntese de ^{14}C lipídios totais;
- f) Razão ADP/ATP celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados um total de 36 ratos machos (*Rattus norvegicus*), pesando aproximadamente 300 ± 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).

Os animais foram mantidos em temperatura controlada (22 ± 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 19531).

Procedimentos Experimentais

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina no início da manhã. O músculo gastrocnêmio e o fígado foram retirados rapidamente e fatiados em uma placa de Petri sobre gelo em tampão Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB) gelado (118 mM de NaCl, 4,8 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄ e 24,8 mM NaHCO₃), pH 7,4.

Para os experimentos, os tecidos branco e vermelho do músculo gastrocnêmico foram misturados em quantidades semelhantes. Os tecidos, provenientes de um mesmo animal, eram divididos para o grupo controle e para as diferentes doses de STC1 e STC2 (Recombinant Human STC 1 and STC 2, HEK 293 cell line, RayBiotech Inc. USA) que variaram de 0,01; 0,1; 10 e 100 ng/mL conforme o protocolo executado.

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 (O₂:CO₂, 95:5%, v/v) durante 30 segundos para a substituição da fase gasosa.

Captação de 1-[¹⁴C]2-desóxi-D-Glicose (2-DG)

Os tecidos (aproximadamente 200 mg de músculo ou de fígado) foram colocados em tubos contendo 500µL de KRB 1% BSA pH 7,4, acrescidos de 0,15µCi de 1-[¹⁴C] 2-desóxi-D-glucose (39mCi / mmol-Amersham) por tubo e diferentes concentrações (0,01; 0,1; 10 e 100 ng/mL) das STCs 1 ou 2. A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O₂:CO₂, 95:5%, v/v). Os tubos foram incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff a 37°C por 1 hora. Ao final do tempo de incubação, os tubos foram imediatamente imersos em recipiente com gelo para interromper a reação de captação de 2-DG. Os tecidos foram removidos do meio de incubação, lavados em KRB gelado pH 7,4, secos em papel filtro e colocados em frascos com tampa de rosca contendo 1mL de água destilada. Após, os frascos foram congelados e fervidos por três vezes alternadamente, para romper as células e liberar o conteúdo intracelular. O conteúdo liberado foi considerado o meio interno e o meio de incubação, o externo (Machado, Wassermann *et al.*, 1991). Para a contagem da radioatividade amostras de 100µL de meio interno ou externo foram colocadas em 2,5 mL de líquido de

cintilação [Tolueno -Triton X100 (2:1) – PPO (04%) e POPOP (0,01%)]. A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac.

Os resultados de captação de glicose foram expressos como relação entre a radioatividade do meio interno (glicose captada pelos tecidos) dividida pela radioatividade do meio externo (meio de incubação) ($T/M = \text{dpm/mL meio interno dividido dpm/mL meio externo}$).

Oxidação de Glicose

Aproximadamente 200 mg de tecido (músculo ou fígado) foram colocados em frascos com tampa de borracha contendo 1 mL de KRB 1% BSA pH 7,4, acrescido de $0,15\mu\text{Ci}$ de ^{14}C de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose (55 mCi/mmol GE-Healthcare) e 5mM glicose na presença das STCs 1 ou 2 nas doses de 0,01; 0,1; 10 e 100 ng/mL. 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}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. Os tecidos foram incubados durante 120 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 2 M 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 $^{14}\text{CO}_2$ formado (Torres, Gamaro *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 $^{14}\text{CO}_2$. Os resultados foram expressos em nmoles de ^{14}C glicose incorporados em $^{14}\text{CO}_2$ por mg de tecido por hora.

Síntese de Glicogênio

Aproximadamente 200 mg de tecido (músculo ou fígado) foram incubados em frascos contendo 500 μL de KRB 1% BSA pH 7,4, acrescido de 0,15 $\mu^{14}\text{Ci}$ de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose (55 mCi/mmol GE-Healthcare) e 5 mM de glicose na presença das isoformas de STCs 1 ou 2 (0,01; 0,1 e 10 ng/ml). A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5%, v/v) e após os tubos foram incubados em banho metabólico (Dubnoff) por 120 minutos a 37°C sob agitação constante. Após o tempo de incubação as reações metabólicas foram interrompidas em banho de gelo e os tecidos foram lavados em KRB gelado, secos em papel de filtro, colocados em tubos de 2mL contendo 200 μl de KOH 0,5 M e incubados a 80°C durante 1 hora. Depois dessa incubação foi separada uma alíquota para a determinação de proteínas e ao volume restante foi adicionado HCl 1N + TCA 30% para desproteinizar as amostras. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante utilizado para a determinação do ^{14}C -glicogênio. Amostras (40 μl) foram pipetadas em papel Whatman 3MM e esses papéis foram submersos por 30 minutos em álcool etílico 66%. O etanol foi trocado e os papéis deixados por mais 15 minutos nessa incubação (Thomas, Schlender *et al.*, 1968). Depois de secos os papéis foram colocados em frascos de contagem contendo 8 ml de líquido de cintilação [Tolueno - Triton X100 (2:1) – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] para a determinação do ^{14}C -glicogênio em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac. Os resultados foram expressos em μg de ^{14}C glicose incorporados em glicogênio por mg de tecido por tempo de incubação.

Síntese de Lipídios Totais

Aproximadamente 300 mg de tecido (músculo ou fígado) foram incubados em banho metabólico pH 7,4 (Dubnoff) a 37°C por 1 hora, sob agitação constante em 1 mL de KRB 1% BSA contendo 0,15 µCi de [U-¹⁴C]-glicose (55 mCi/mmol GE-Healthcare) e 5mM de glicose em presença das isoformas de STCs 1 ou 2 (0,01; 0,1 e 10 ng/ml). Após o tempo de incubação as reações metabólicas foram interrompidas em banho de 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 ¹⁴C-lipídios foram extraídos segundo método descrito por Folch et al. (1957). Após a evaporação do clorofórmio os ¹⁴C-lipídios foram dissolvidos em 5mL de Tolueno- PPO 0,4% e a radioatividade contada em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac. Os resultados foram expressos como milimoles de ¹⁴C-glicose incorporados em ¹⁴C-lipídios totais.g⁻¹ de tecido.h⁻¹ de incubação.(Folch, Lees *et al.*, 1957)

Determinação da Atividade da Enzima Piruvato Cinase (PK) (EC 2.7.1.40)

As fatias de músculo e fígado (aproximadamente 300 mg) foram colocadas em tubos com solução fisiológica na presença isoformas de STCs (0,01 e 0,1 ng/ml) após uma incubação em banho metabólico do tipo Dubnoff a 37°C por 1 hora. Após o tempo de incubação os tubos foram imediatamente colocados em gelo e os tecidos foram, então, homogeneizados (Homogeneizador Teflon tipo Potter–Elvehjem) em 20 volumes de tampão sacarose (0,32 M de sacarose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA e 1 mM PMSF). O

homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da concentração de proteínas e da atividade específica da PK. As amostras (10µl) foram incubadas por 30 minutos em um meio contendo tampão Tris -HCl 0,1 M, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0,16 mM NADH, 75 mM KCl, 5.0 mM ADP, 1 unidade de L-lactato desidrogenase (LDH), 0,1% (v/v) Triton X-100. A reação é iniciada com a adição de 1 mM fosfoenolpiruvato (PEP) e a leitura do consumo do NADH é feita a cada 30 segundos por 2 minutos em espectrofotômetro a 340 nm. Todos os ensaios foram feitos em duplicata a 25°C. Os resultados foram representados em micromoles de NADH consumidos por minuto por mg de tecido (Feksa, Cornelio *et al.*, 2003).

Determinação ADP/ATP

As fatias de músculo e fígado (aproximadamente 100 mg) foram colocadas em tubos com KRB 1% BSA na presença das isoformas de STCs 1 ou 2 (0,01 e 0,1 ng/ml) e foram incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff a 37°C por 1 hora. Após o tempo de incubação os tubos foram imediatamente colocados em gelo e os tecidos foram, então, homogeneizados no Omni Mixer em tampão de lise (NaF 20 mM, gelatina 0,4 g/L, TCA 6% e solução fisiológica). As amostras foram centrifugadas a 9.500 rpm durante 3 minutos a 4 °C. O sobrenadante teve seu pH neutralizado (pH = 7) com uma solução de Na₂CO₃ 2 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.

Análise Bioquímica

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/ml. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 595 nm e os resultados expressos em mg/ml.

Análise Estatística

Para o cálculo do “n” (número mínimo de animais), baseado na análise da atividade da enzima piruvato cinase, no Computer Programs for Epidemiologists (WIN PEPI – versão 9.1), utilizando-se dados de estudo prévio (Kawashita, Brito *et al.*, 2002). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90%, nenhuma perda foi assumida para esse estudo. Assim, chegou-se a um número amostral de 12 animais por grupo (3 grupos (Controle, Stanioalcina humana 1, Stanioalcina humana 2) – 36 animais no total).

Com base nos resultados das análises foram calculadas as médias e os erros padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a comparação entre os grupos foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, complementado com o teste Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $P < 0,05$ (software Sigma Stat).

Proteção ao pesquisador

Durante a execução dos objetivos propostos, os pesquisadores envolvidos usaram luvas de procedimentos cirúrgicos e aventais para sua própria proteção. Quando foi necessário, foram utilizados também máscara e óculos de proteção. Além destes cuidados, a preparação das soluções ocorreu dentro de capela de exaustão. O descarte dos resíduos não tóxicos foi feito no sistema de esgoto comum. Os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de sua eliminação.

O Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), onde foi realizado o presente estudo, possui autorização para manipulação de radioisótopos e os resíduos foram descartados segundo as normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

Tratamento de resíduos

Os resíduos de amostras biológicas foram congelados a -20°C até o recolhimento. Luvas e demais materiais que contenham resíduos biológicos, bem como materiais perfuro cortantes, foram devidamente separados, embalados, identificados e recolhidos. As carcaças dos animais foram congeladas e entregues ao biotério para eliminação adequada.

4. RESULTADOS

4.1 Estudo “*in vitro*” da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de 2DG no músculo e no fígado de *Rattus norvegicus*

No fígado (Figura 4.1A) e no músculo (Figura 4.1B) os dados demonstram que as STC 1 e 2 não alteram significativamente a captação de glicose nestes tecidos. As médias de captação de 2DG nas diferentes doses dos hormônios mostraram valores semelhantes aqueles do grupo controle.

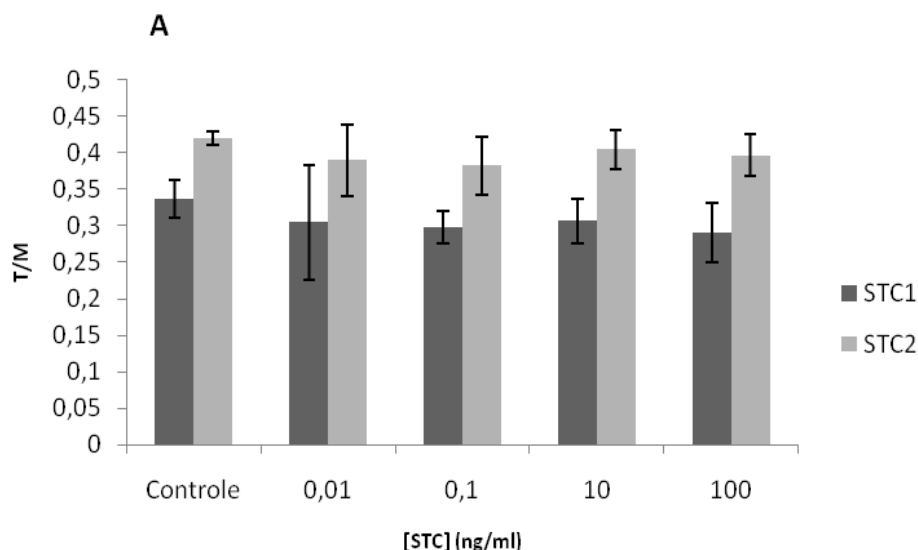


Figura 4.1A: Captação de 1-[¹⁴C]-2-desóxi-D-glicose no fígado de *Rattus norvegicus* em diferentes doses (0,01ng/mL; 0,1ng/mL; 10ng/mL e 100 ng/mL) de STC1 ou de STC2 (n=4). Resultados expressos na relação T/M(tecido/meio). As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média.

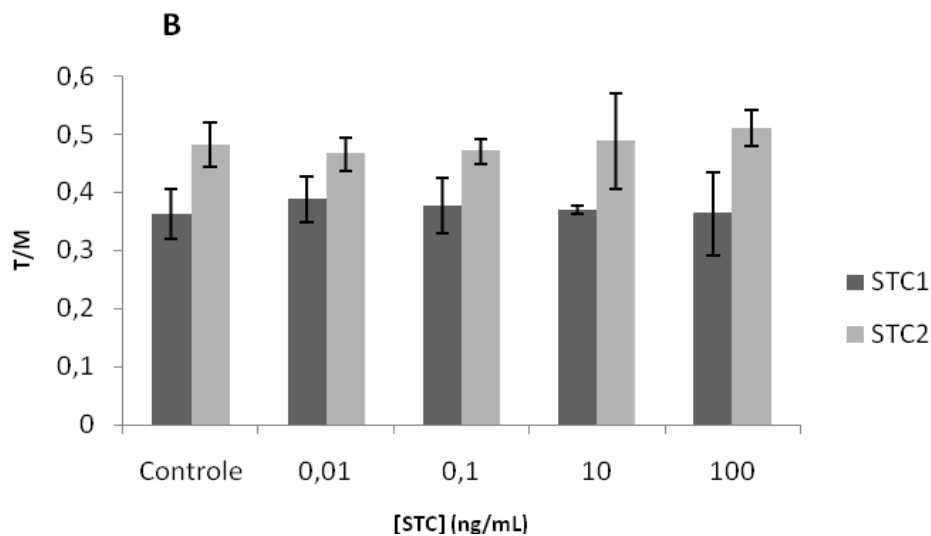


Figura 4.1B: Captação de 1-[¹⁴C]-2-desóxi-D-glicose no músculo de *Rattus norvegicus* em diferentes doses (0,01ng/ml; 0,1ng/mL; 10ng/mL e 100 ng/mL) de STC1 ou de STC2 (n=4). Resultados expressos na relação T/M (tecido/meio). As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média.

4.2 Estudo “*in vitro*” da ação de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre incorporação do ¹⁴C da glicose em ¹⁴CO₂ no fígado e no músculo de *Rattus norvegicus*

A incubação do tecido hepático em presença de STC1 (Figura 4.2A) nas concentrações de 0,01 ng/ml e 10 ng/mL diminuiu em 48% ($p < 0,05$) a formação de ¹⁴CO₂. Com a concentração de 0,1 ng/mL de STC 1 a formação de ¹⁴CO₂ diminuiu em 25% ($p > 0,05$), enquanto que na maior dose utilizada (100 ng/mL) os valores foram semelhantes aqueles do grupo controle.

As doses de 0,01 e 0,1ng/mL de STC 2 não alteraram significativamente a formação de $^{14}\text{CO}_2$ no fígado. Já a dose de 10ng/ mL reduziu a formação de $^{14}\text{CO}_2$ no fígado em 45% ($p < 0,05$) quando comparada aquela do grupo controle.

No músculo (Figura 4.2B) a STC1 nas doses utilizadas não alterou significativamente a formação de $^{14}\text{CO}_2$. A STC 2 na dose de 10 ng/mL reduziu 47% ($p < 0,05$) a formação de $^{14}\text{CO}_2$ no músculo, as outras concentrações do hormônio não alteraram significativamente a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose

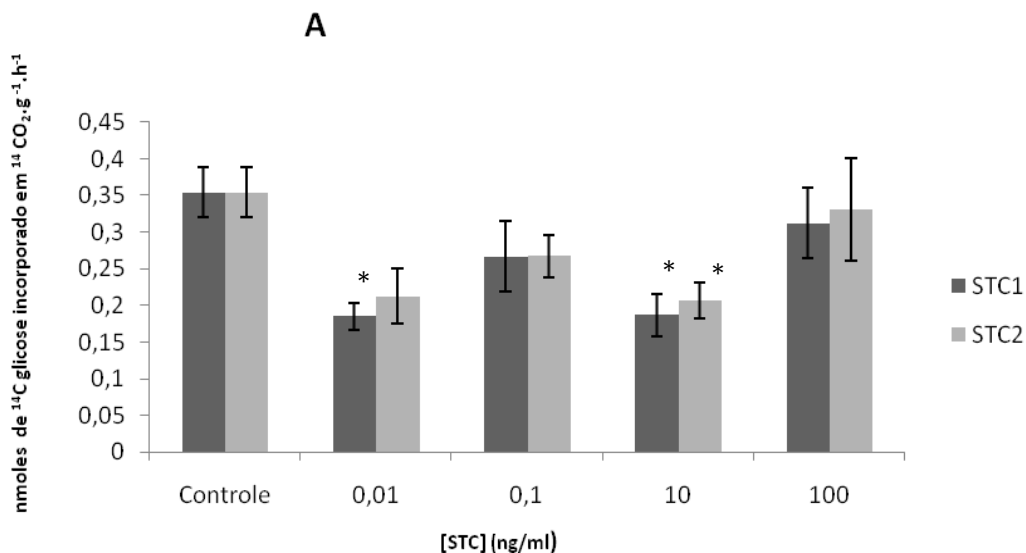


Figura 4.2A: Oxidação de [U- ^{14}C]- glicose no fígado de *Rattus norvegicus* em presença de diferentes doses (0,01ng/mL; 0,1ng/mL; 10ng/mL e 100 ng/mL) de STC1 ou de STC2 (n=6-7). Resultados foram expressos em nmoles de $^{14}\text{CO}_2$ formado por grama de tecido por hora de incubação. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

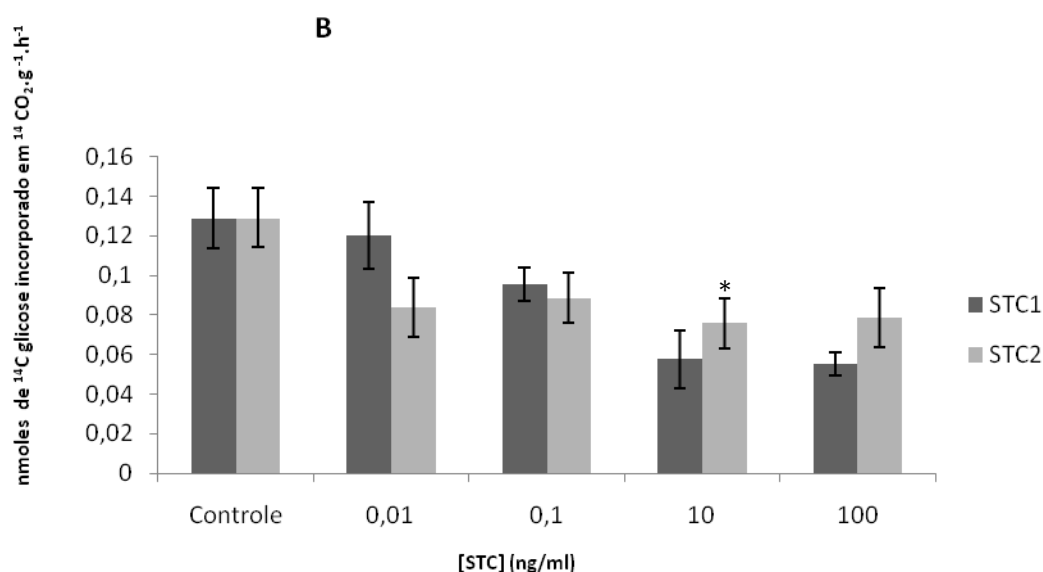


Figura 4.2B: Oxidação de [U-¹⁴C] glicose no músculo de *Rattus norvegicus* em presença de diferentes doses (0,01ng/mL; 0,1ng/mL; 10ng/mL e 100 ng/mL) de STC1 ou de STC2 (n=6-7). Resultados foram expressos em nmoles de ¹⁴CO₂ formado por grama de tecido por hora de incubação. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle (p < 0,05).

4.3 Estudo “in vitro” da ação de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a atividade da enzima piruvato cinase(PK) no fígado e no músculo de *Rattus norvegicus*

A STC1 nas doses utilizadas neste estudo (0,01 ng/mL e 0,1 ng/mL) não alterou significativamente a atividade da enzima PK no fígado (Figura 4.3A). Nesse mesmo tecido a STC2 aumentou cerca de 77% (p < 0,05) a atividade da PK na dose de 0,01 ng/mL. Na dose de 0,1 ng/mL os valores de atividade da PK aproximam-se daqueles do grupo controle (Figura 4.3A).

No músculo a STC 1 nas concentrações utilizadas neste trabalho (0,01 e 0,1 ng/mL) diminuiu significativamente ($p < 0,05$) os valores de atividade da enzima PK (Figura 4.3B). Entretanto, a isoforma STC2 aumentou cerca de 44% ($p < 0,05$) a atividade da PK muscular na dose de 0,01 ng/mL e de 49% ($p < 0,05$) na dose de 0,1 ng/mL (Figura 4.3B).

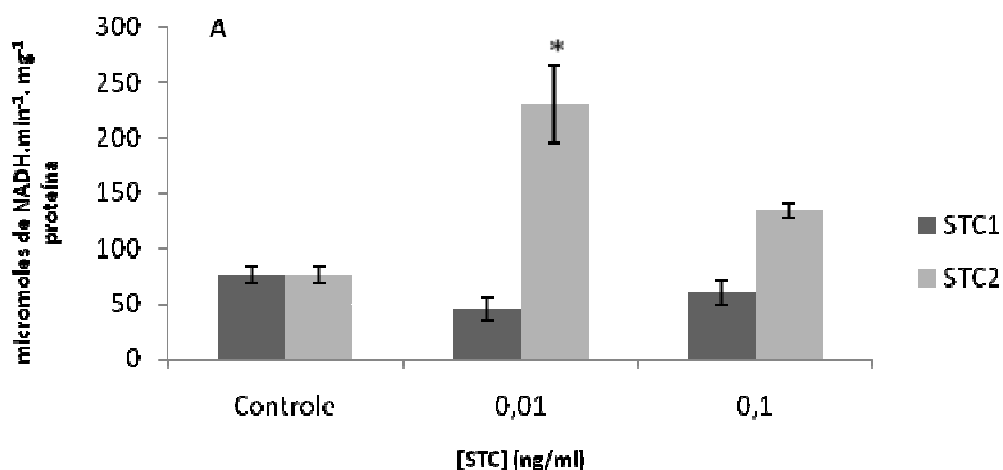


Figura 4.3A: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL e 0,1ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a atividade da enzima piruvato cinase no fígado de *Rattus norvegicus* (n=4-5). Resultados expressos em micromoles de NADH consumidos por minuto por mg de proteína. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

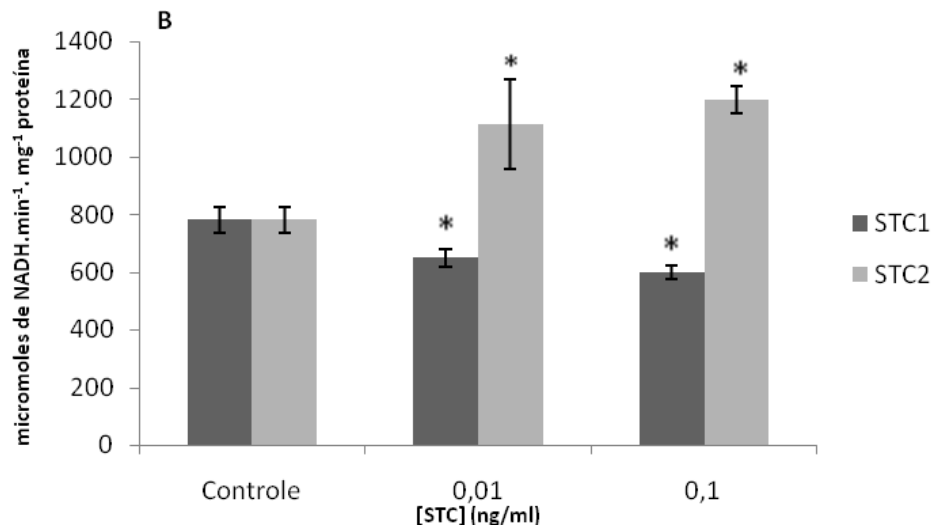


Figura 4.3B: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL e 0,1ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a atividade da enzima piruvato cinase no músculo de *Rattus norvegicus* (n=4-5). Resultados expressos em micromoles de NADH consumidos por minuto por mg de proteína. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.4 Estudo “*in vitro*” da ação de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre incorporação do ¹⁴C da glicose em ¹⁴C glicogênio no fígado e no músculo de *Rattus norvegicus*

No tecido hepático (Figura 4.4A), nenhuma das duas isoformas de STC modificou significativamente a capacidade de síntese de glicogênio a partir de ¹⁴C glicose.

No músculo (Figura 4.4B) as duas isoformas de STCs nas concentrações de 0,01ng/mL; 0,1 ng/mL e 10 ng/ml aumentaram ($p < 0,05$) a incorporação do ¹⁴C da glicose em ¹⁴C glicogênio. No tecido muscular, o aumento máximo de 3,4 vezes ($p < 0,05$) na

incorporação de ^{14}C glicose em ^{14}C glicogênio foi em presença de 0,01 ng/mL e 10 ng/mL de STC1. Já com STC 2 o aumento máximos de 3,7 vezes ($p < 0,05$) foi com a dose de 0,01ng/mL.

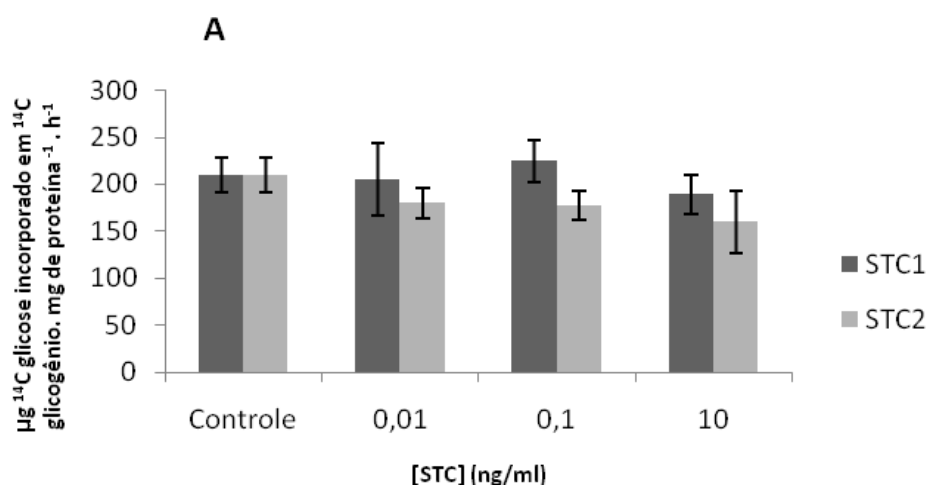


Figura 4.4A: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL; 0,1ng/mL; 10ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de $[U-^{14}\text{C}]$ glicose em ^{14}C glicogênio no fígado de *Rattus norvegicus* (n=6). Resultados expressos em micrograma de ^{14}C glicose incorporada em ^{14}C glicogênio por mg de proteína por hora de incubação. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão da média.

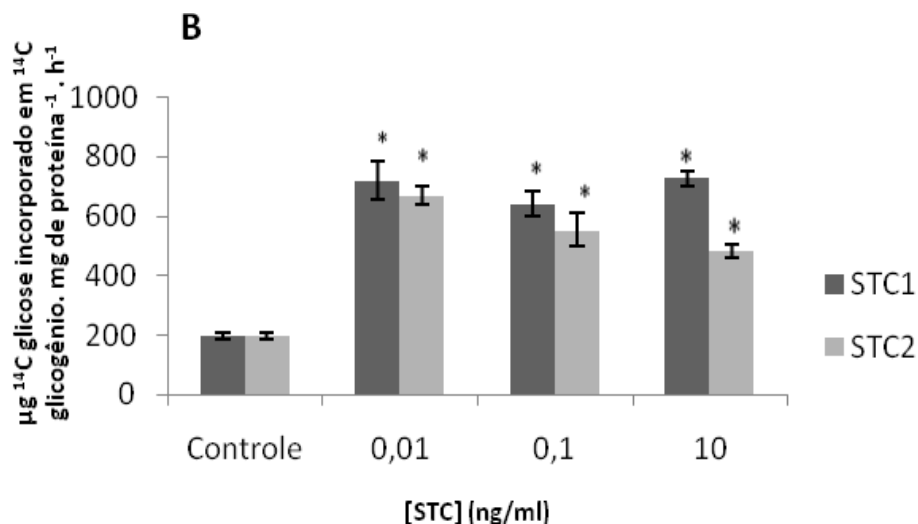


Figura 4.4B: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL; 0,1ng/mL; 10ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de [U-¹⁴C]glicose em ¹⁴C glicogênio no músculo de *Rattus norvegicus* (n=6). Resultados expressos em micrograma de ¹⁴C glicose incorporada em ¹⁴C glicogênio por mg de proteína por hora de incubação. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle (p < 0,05).

4.5 Estudo “*in vitro*” da ação de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de ¹⁴C glicose em ¹⁴C lipídios totais no fígado e no músculo de *Rattus norvegicus*

A STC1 estimulou (p<0,05) a incorporação de ¹⁴C glicose em ¹⁴C lipídios totais nos dois tecidos estudados. No fígado (Figura 4.5A) a STC 1 nas concentrações de 0,1 ng/mL e de 10 ng/mL aumentou cerca de duas vezes (p<0,05) a capacidade de síntese de ¹⁴C lipídios totais.

No músculo as concentrações de STC 1 de 0,01 ng/mL e de 0,1 ng/mL aumentaram marcadamente, 140% e 210%, respectivamente, a capacidade de síntese de ^{14}C -lipídios totais a partir de ^{14}C glicose (Figura 4.5B). Contudo, na dose de 10ng/ml os valores de incorporação da ^{14}C -glicose em ^{14}C -lipídios no músculo são semelhantes aqueles do grupo controle (Figura 4.5B).

As diferentes doses de STC2 utilizadas neste estudo não alteração significativamente a incorporação da ^{14}C glicose em ^{14}C -lipídios totais no fígado (Figura 4.5A) e no músculo (Figura 4.5B) de ratos.

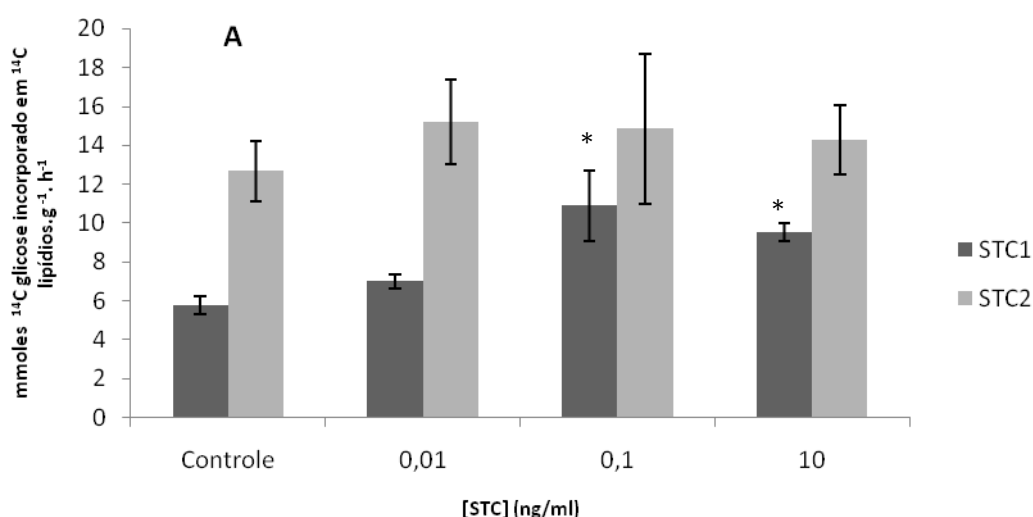


Figura 4.5A: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL; 0,1ng/mL; 10ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicose em ^{14}C lipídios totais no fígado de *Rattus norvegicus* (n=4-5). Resultados expressos em milimoles de ^{14}C -glicose incorporados em ^{14}C -lipídios por grama de tecido por hora de incubação. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

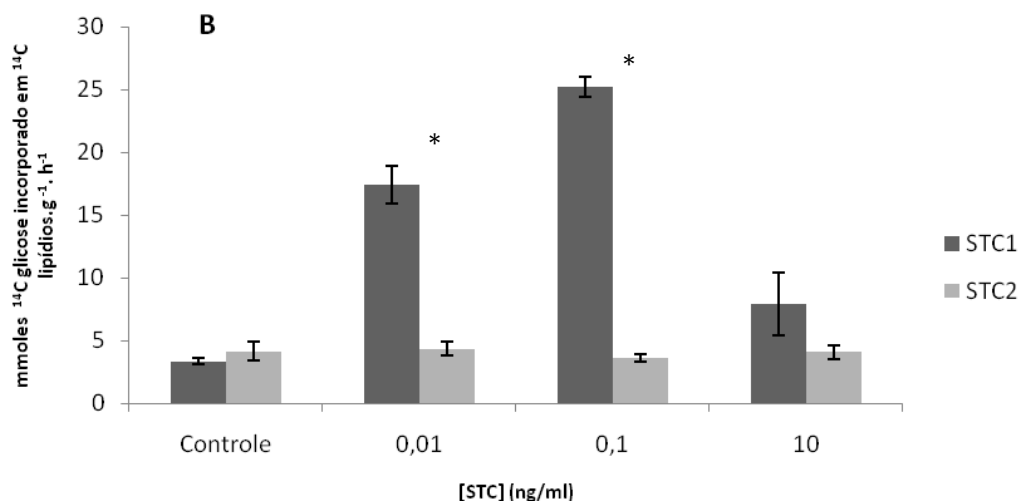


Figura 4.5B: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL; 0,1ng/mL; 10ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a incorporação de [U-¹⁴C]glicose em ¹⁴C lipídios totais no músculo de *Rattus norvegicus* (n=4-5). Resultados expressos em milimoles de ¹⁴C-glicose incorporados em ¹⁴C-lipídios por grama de tecido por hora de incubação. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle (p < 0,05).

4.6 Efeito de diferentes doses de STC 1 e de STC 2 sobre a relação ADP/ATP no fígado e no músculo de *Rattus norvegicus*

No fígado (Figura 4.6A) a dose de 0,01 ng/mL de STC 1 ou STC 2 aumentou a relação ADP/ATP. A STC1 aumentou em 64% (p < 0,05) a relação ADP/ATP na dose de 0,01 ng/mL, enquanto que a relação ADP/ATP permaneceu igual àquela do controle com a dose de 0,1 ng/mL. Já o aumento da relação ADP/ATP em presença de STC2 foi dose dependente; a maior dose (0,1 ng/mL) aumentou cerca 2,0 vezes esta relação (Figura 4.6A).

No músculo (Figura 4.6B) as doses dos hormônios STC1 e STC2 utilizadas neste estudo não alteraram significativamente a relação ADP/ATP.

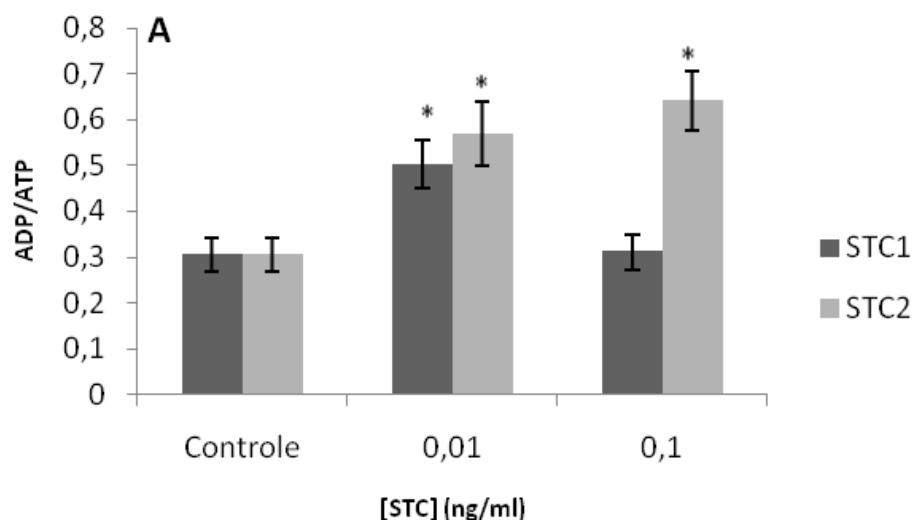


Figura 4.6A: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL e 0,1ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a relação ADP/ATP no fígado de *Rattus norvegicus* (n=2-4). As colunas e barras representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

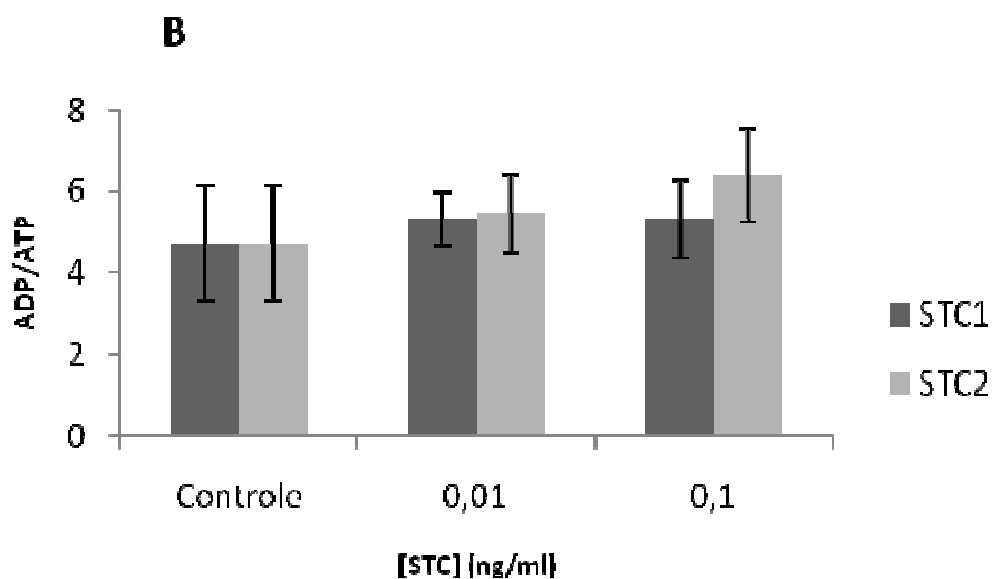


Figura 4.6B: Efeito de diferentes doses (0,01ng/mL; 0,1ng/mL) de STC 1 e de STC 2 sobre a relação ADP/ATP no músculo de *Rattus norvegicus* (n=3-4). As colunas e barras representam, respectivamente, as médias \pm erro padrão da média.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos diversos estudos sobre ações da STC 1 têm enriquecido o conhecimento sobre o papel fisiológico e bioquímico deste hormônio em mamíferos (Yoshito e Aubi, 2004). Entretanto, a função da STC 2 em mamíferos permanece, ainda, pouco conhecida.

Devido a semelhança na sequência de aminoácidos entre as moléculas de STC 1 e 2, é tentador acreditar que haja uma sobreposição entre as funções das duas moléculas. Existem, no entanto, entre as STCs diferenças na estrutura, na expressão e na ligação ao receptor putativo que, provavelmente, concedam a essas duas moléculas especificidade e diferenças funcionais (Chang & Reddel, 1998, Varghese et al., 1998; McCudden et al., 2002; Chang et al., 2003).

A STC2, um homólogo da STC-1, foi descrita inicialmente em mamíferos e mais recentemente foi identificada no peixe-zebra. Em mamíferos, a STC2 também está envolvida nos processos de reprodução (na implantação e decidualização do embrião) (Xiao, Yuan *et al.*, 2006), de crescimento e de metabolismo (Varghese, Gagliardi *et al.*, 2002; Xiao, Yuan *et al.*, 2006). Estudos realizados em camundongos demonstraram que a STC2, em oposição a STC1, aumenta a sua expressão na fase adulta. Na linhagem transgênica de ratos que superexpressavam a STC2, foi verificado que a expressão constitutiva da mesma resulta em retardo de crescimento e de desenvolvimento (notavelmente na formação da sutura cranial), podendo ser letal entre 26 e 34% dos neonatos. Esses camundongos também são hiperfágicos, embora, a hiperfagia não esteja associada à obesidade. Contudo, os níveis plasmáticos de cálcio e fosfato não são afetados pela superexpressão da STC2 em camundongos transgênicos. Assim, parece que a STC2 atuaria mais como um inibidor do crescimento, promovendo a redução do desenvolvimento intramembranoso e endocondral ósseo e da musculatura

esquelética (Gagliardi et al., 2005).

Em 2002, McCudden e colaboradores utilizaram a proteína STC 1 fusionada a fosfatase alcalina (STC1-AP) demonstraram a existência de receptores para este hormônio em diferentes tecidos. Os autores constataram, *in situ*, ligação de alta afinidade de STC1-AP na superfície celular do fígado. Embora os níveis de RNAm de STC 1 sejam relativamente baixos no músculo esquelético foi observado após a injeção de STC-1 humana marcada com radioativo um acúmulo deste hormônio neste tecido, indicando a presença de sítios de ligação ao hormônio (De Niu et al, 2000).

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que as STC 1 e 2, além das funções citadas, teriam também a função de hormônios reguladores do metabolismo da glicose no músculo e no fígado de ratos. Os resultados mostram que, conforme o tecido estudado, as ações metabólicas desses hormônios podem ser antagônicas. Devido à ausência na literatura consultada de estudos pontuais sobre os efeitos metabólicos das STC 1 e 2 sobre o metabolismo intermediário, a discussão deste trabalho apresenta poucas referências comparativas.

Apesar das células musculares e hepáticas utilizarem diferentes proteínas transportadoras para a glicose, as STC 1 e 2, nas concentrações utilizadas neste estudo, não alteraram a capacidade de transportar glicose através das membranas destas células. Contudo, esses hormônios agiram marcadamente sobre as vias metabólicas de utilização intracelular da glicose no músculo e no fígado de ratos.

No fígado, a STC 1 e 2 reduziram a capacidade de oxidação da ¹⁴C-glicose. Entretanto, no músculo somente a STC 2, em dose elevada (10ng/mL), possui efeito sobre a capacidade de oxidação da glicose. Estes achados sugerem que estes hormônios possuem um controle sobre o ciclo de Krebs, regulando a geração de energia e a distribuição de substratos para vias de síntese, como por exemplo, lipídios e glicose. Recentemente, foi verificado que a STC 1

reduz marcadamente a capacidade de incorporação de ^{14}C -glutamina em ^{14}C -glicose e a atividade da PEPCK no túbulo renal proximal de ratos (dados submetidos à publicação).

Com o objetivo de investigar se a redução na capacidade de oxidação da glicose, no tecido hepático e no muscular, seria devido à redução na atividade da via glicolítica, foi investigado o efeito das STC 1 e 2 sobre a atividade da enzima PK hepática e muscular. A STC 1 não interfere na atividade da enzima PK hepática. Entretanto, no fígado, a STC 1 aumenta a síntese de lipídios a partir da ^{14}C -glicose. Esta ação estimulatória da STC 1 sobre a síntese de lipídios no fígado sugere que a redução na capacidade de oxidação de glicose por ação do hormônio seria explicada, em parte, pelo desvio da ^{14}C -glicose para a síntese de lipídios totais.

O aumento da atividade da PK hepática sobre a ação da STC 2 seria uma resposta ao aumento da relação ADP/ATP constatada neste tecido. Estes achados sugerem que a redução na oxidação da glicose no fígado teria diminuído a formação de ATP pela cadeia respiratória e, assim, levado ao aumento compensatório da atividade da PK.

No presente trabalho o aumento da relação ADP/ATP no tecido hepático, pode ser explicado pela lipogênese, pela redução da oxidação da glicose e como sugerido por Ellard e colaboradores, pelo efeito desacoplador da STC 1 na cadeia respiratória. O efeito desacoplador da STC 1 na cadeia respiratória foi proposto por Ellard e colaboradores (2007), em estudo com preparações de mitocôndrias do tecido hepático e muscular de ratos. Os autores demonstraram a existência de receptores mitocondriais para o hormônio STC 1 na membrana interna desta organela. Estes autores mostraram que a STC 1 aumenta a atividade da cadeia respiratória. Entretanto, a relação ADP:O foi reduzida em presença de STC 1 em mitocôndrias de fígado e de músculo (Ellard et al., 2007). Assim, a STC 1 teria um efeito desacoplador na cadeia respiratória, reduzindo a produção de ATP; este efeito da STC 1

também foi constatado em células intactas (Ellard et al., 2007). Embora, o mecanismo pelo qual a STC 1 exerceria sua função desacopladora ainda não seja conhecido, foi constatado que este hormônio também aumenta a captação de cálcio que teria um efeito aditivo na função desacopladora deste hormônio (Ellard et al., 2007); o aumento do efluxo de cálcio seria via trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ na membrana interna da mitocôndria (Gunter e Gunter, 1994). Estudo prévio sugere que o ciclo de cálcio pela mitocôndria aumenta o vazamento de prótons (Brookes, 2005). Entretanto, estudos futuros determinado o efeito da STC 1 sobre os controles da atividade de enzimas do ciclo de Krebs e da fisiologia cadeia respiratória, assim como, sobre a síntese de lipídios no fígado serão esclarecedores para o entendimento da ação deste hormônio sobre o metabolismo intermediário no hepatócito.

Neste estudo pedaços de tecido do músculo gastrocnêmio branco e vermelho foram utilizados nas incubações com o hormônio, assim, nestas preparações havia a presença de adipócitos intramusculares. Estudos com adipócitos isolados demonstram a presença de RNAm de STC 1 e de receptores para a STC 1 na membrana do adipócito e na membrana da gota de gordura (formada pelas perilipinas) (Paciga, Hirvi *et al.*, 2005). Os autores sugerem que as STCs teriam um papel regulador sobre o metabolismo de lipídios (Paciga et al., 2005). No presente estudo o marcante aumento na síntese de lipídios constatado no músculo gastrocnêmio a partir de ^{14}C -glicose em presença da STC 1, provavelmente, esteja ocorrendo nos adipócitos intramusculares. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade da STC 1 também aumentar a reserva de triacilglicerol nas fibras musculares. Esta reserva de triacilglicerol é localizada em regiões adjacentes à mitocôndria muscular, sugerindo uma função como substratos prontamente disponíveis durante o exercício físico (Van Loon e Goodpaster, 2006).

O aumento da síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -glicose em presença de

diferentes concentrações de STC 1, contribuiu para a redução da atividade da PK muscular. Porém, a alteração não contribuiu para a redução na formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose. O desvio da glicose-6-fosfato para a síntese de glicogênio reduz no fluxo da glicose pela via glicolítica. Contudo, estudos mais aprofundados sobre o efeito da STC 1 no fluxo de carbono no músculo esquelético serão necessários para comprovar essas hipóteses. No fígado, o hormônio nas concentrações utilizadas neste trabalho não alterou a síntese de glicogênio, mostrando a diferença de resposta tecidual à ação da STC 1.

A STC 2 parece possuir uma ação importante sobre a via glicolítica muscular, pois aumenta marcadamente a atividade da PK. As doses que foram efetivas no aumento da atividade da PK, não alteraram a oxidação da glicose neste tecido. A STC 2 aumenta também a síntese de glicogênio no tecido muscular esquelético, desta forma, o aumento da atividade da PK neste tecido seria compensatório pelo aumento da síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -glicose. Estes resultados sugerem um papel regulador da STC 2 sobre a entrada do substrato no ciclo de Krebs e, assim, mantém a relação ADP/ATP estável no tecido muscular. Entretanto, estudos complementares sobre a atividade da via glicolítica e o ciclo de Krebs serão necessários para esclarecer o papel da STC 2 sobre a geração de energia no tecido muscular.

6.CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os hormônios STC 1 e 2 participam do controle do metabolismo intermediário em mamíferos. Estes hormônios regulam o metabolismo da glicose agindo sobre vias de síntese e de geração de energia, aumentando a relação ADP/ATP no tecido hepático, mas mantendo esta relação em valores semelhantes aqueles do grupo controle no músculo. O presente trabalho sugere que as STC 1 e 2 atuam sobre receptores distintos no músculo e no fígado, pois apresentam ações antagônicas sobre determinadas vias, exemplo, controle da atividade da enzima PK no músculo. Outro achado importante deste estudo foi que as ações da STC 1 e 2 sobre metabolismo da glicose ocorrem com baixas concentrações no meio de incubação, quando comparadas aquelas utilizadas em outros trabalhos encontrados na literatura.

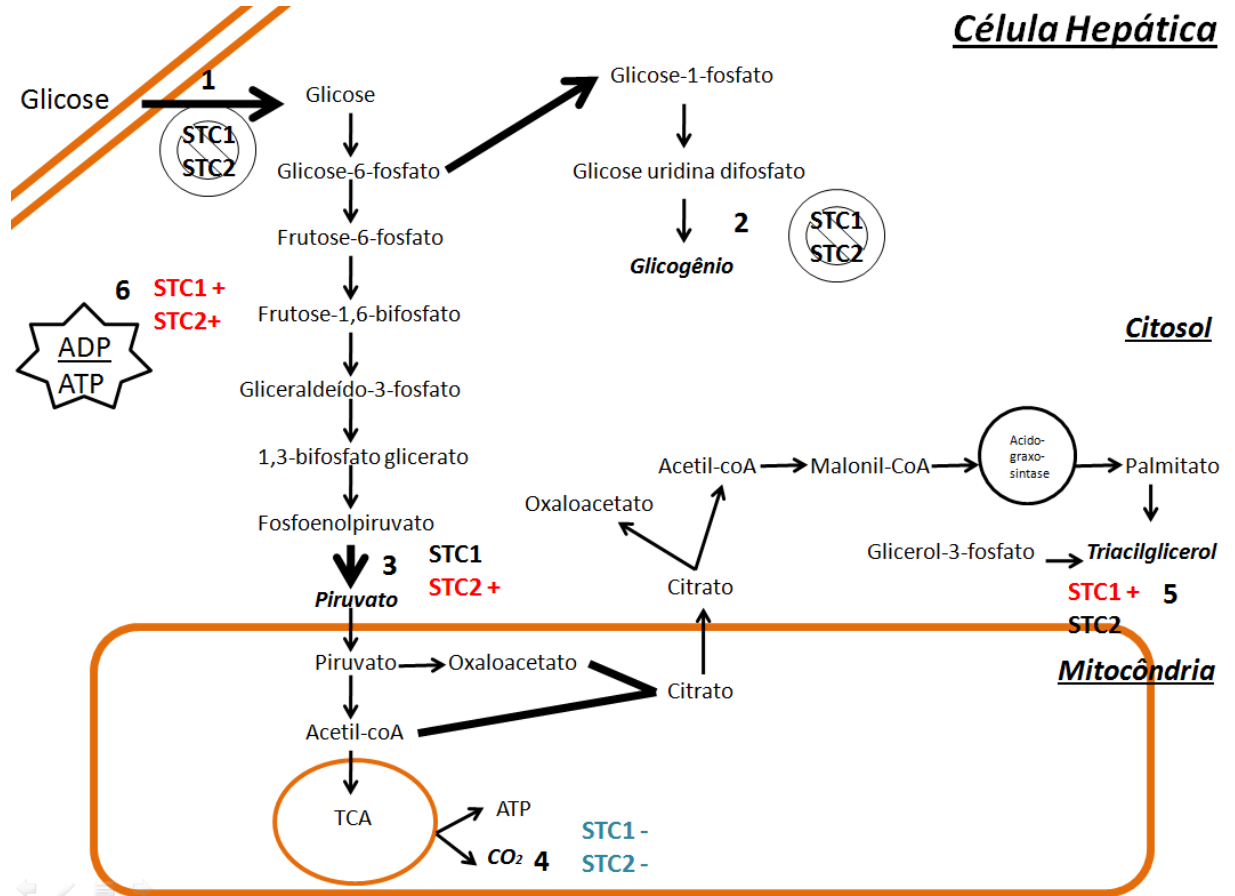
Neste estudo, quando doses mais elevadas foram utilizadas os valores dos parâmetros analisados eram semelhantes aqueles constatados nos grupos controles. Em mamíferos as STC 1 e 2 apresentam uma ação parácrina, o que explicaria a efetividade de doses baixas para as ações metabólicas destes hormônios.

Esta constatação sugere que, concentrações muito elevadas de STC 1 ou 2 podem regular para baixo a capacidade de ligação ou a afinidade do hormônio ao receptor.

Nas figuras abaixo estão representados esquematicamente os resultados obtidos neste trabalho.

Ação dos hormônios peptídicos STC1 e STC2 no metabolismo da glicose do tecido

hepático de *Rattus norvegicus*

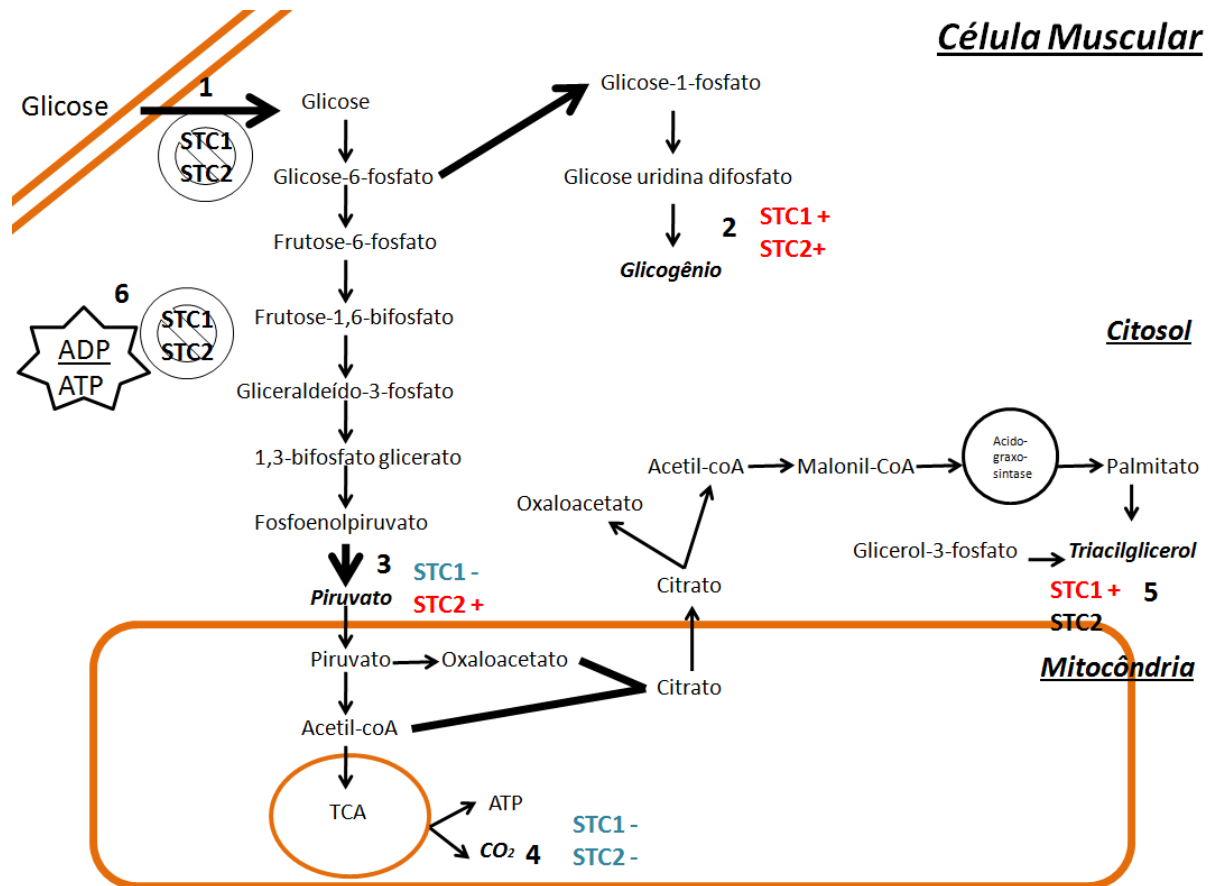


Adaptado de (Smith, Marks *et al.*, 2007; Salway, 2009)

Figura 6.1: Ação dos hormônios peptídicos STC1 e STC2 no metabolismo da glicose do tecido hepático de *Rattus norvegicus*. 1- captação de 2DG; 2- Síntese de 14C glicogênio; 3- Atividade da enzima piruvato cinase; 4- Formação de 14CO₂ a partir de 14C glicose; 5- Síntese de 14C lipídios; 6- Relação ADP:ATP celular.

⊖ sem influência das STCs; Vermelho: papel estimulatório das STCs; Azul: papel inibitório das STCs.

Ação dos hormônios peptídicos STC1 e STC2 no metabolismo da glicose do tecido muscular de *Rattus norvegicus*



Adaptado de (Smith, Marks *et al.*, 2007; Salway, 2009)

Figura 6.2: Ação dos hormônios peptídicos STC1 e STC2 no metabolismo da glicose do tecido muscular de *Rattus norvegicus*. 1- captação de ^{14}C glicose; 2- Síntese de ^{14}C glicogênio; 3- Atividade da enzima piruvato cinase; 4- Formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C glicose; 5- Síntese de ^{14}C lipídios; 6- Razão do ADP:ATP celular.

⊖ sem influência das STCs; Vermelho: papel estimulatório das STCs; Azul: papel inibitório das STCs.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

AMEMIYA, Y. et al. Stanniocalcin from an ancient teleost: a monomeric form of the hormone and a possible extracorporeal distribution. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, n. 1-2, p. 141-50, Feb 25 2002.

BERNE, R. M. et al. **Fisiologia**. 5. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. I

BROOKES, P. S. Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. **Free Radic Biol Med**, v. 38, n. 1, p. 12-23, Jan 1 2005.

CHANG, A. C. et al. The murine stanniocalcin 1 gene is not essential for growth and development. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 23, p. 10604-10, Dec 2005.

CHANG, A. C. et al. Molecular cloning and characterization of mouse stanniocalcin cDNA. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 124, n. 1-2, p. 185-7, Nov 29 1996.

CHANG, A. C. et al. The murine stanniocalcin 2 gene is a negative regulator of postnatal growth. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2403-10, May 2008.

CHANG, A. C. et al. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 112, n. 2, p. 241-7, Aug 11 1995.

CHANG, A. C.; JELLINEK, D. A.; REDDEL, R. R. Mammalian stanniocalcins and cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 10, n. 3, p. 359-73, Sep 2003.

CHANG, A. C.; REDDEL, R. R. Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 141, n. 1-2, p. 95-9, Jun 25 1998.

DE NIU, P. et al. Immunolocalization of stanniocalcin in human kidney. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 155-9, Feb 1998.

DEOL, H. K. et al. Dynamic regulation of mouse ovarian stanniocalcin expression during gestation and lactation. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3412-21, Sep 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. 137-40, Nov 25 1998.

ELLARD, J. P. 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, Jan 29 2007.

FEKSA, L. R. et al. Characterization of the inhibition of pyruvate kinase caused by phenylalanine and phenylpyruvate in rat brain cortex. **Brain Research**, v. 968, n. 2, p. 199-205, Apr 11 2003.

FILVAROFF, E. H. et al. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3681-90, Sep 2002.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, May 1957.

GAGLIARDI, A. D. et al. Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 1, p. E92-105, Jan 2005.

GUERREIRO, P. M. et al. Parathyroid hormone-related protein: a calcium regulatory factor in sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, n. 3, p. R855-60, Sep 2001.

GUNTER, K. K.; GUNTER, T. E. Transport of calcium by mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, v. 26, n. 5, p. 471-85, Oct 1994.

ISHIBASHI, K.; IMAI, M. Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 282, n. 3, p. F367-75, Mar 2002.

ISHIBASHI, K. et al. Molecular cloning of a second human stanniocalcin homologue (STC2). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 250, n. 2, p. 252-8, Sep 18 1998.

ITO, D. et al. Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 21, p. 9456-69, Nov 2004.

KAWASHITA, N. H. et al. Glucose uptake, glucose transporter GLUT4, and glycolytic enzymes in brown adipose tissue from rats adapted to a high-protein diet. **Metabolism**, v. 51, n. 11, p. 1501-5, Nov 2002.

LAW, A. Y. et al. Vasopressin controls stanniocalcin-1 gene expression in rat and mouse kidney. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 183-8, Jan 2 2012.

LU, M.; WAGNER, G. F.; RENFRO, J. L. Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. **Am J Physiol**, v. 267, n. 5 Pt 2, p. R1356-62, Nov 1994.

LUO, C. W.; PISARSKA, M. D.; HSUEH, A. J. Identification of a stanniocalcin paralog, stanniocalcin-2, in fish and the paracrine actions of stanniocalcin-2 in the mammalian ovary. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 469-76, Jan 2005.

MACHADO, V. L.; WASSERMANN, G. F.; MARQUES, M. In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and alpha-aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorsalis*). **Gen Comp Endocrinol**, v. 82, n. 1, p. 8-13, Apr 1991.

MCCUDDEN, C. R. et al. Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 47, p. 45249-58, Nov 22 2002.

MOORE, E. E. et al. Stanniocalcin 2: characterization of the protein and its localization to human pancreatic alpha cells. **Horm Metab Res**, v. 31, n. 7, p. 406-14, Jul 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Quinta. Porto Alegre: artmed, 2011.

NORDLIE, R. C.; FOSTER, J. D.; LANGE, A. J. Regulation of glucose production by the liver. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 379-406, 1999.

OLSEN, H. S. et al. Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 5, p. 1792-6, Mar 5 1996.

PACIGA, M. et al. Characterization of big stanniocalcin variants in mammalian adipocytes and adrenocortical cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 289, n. 2, p. E197-205, Aug 2005.

RADMAN, D. P. et al. Evidence for calcium-sensing receptor mediated stanniocalcin secretion in fish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 186, n. 1, p. 111-9, Jan 15 2002.

SALWAY, J. G. **Metabolismo Passo a Passo**. 3. Porto Alegre: Artmed, 2009.

SERLACHIUS, M. **Stanniocalcin-1 in cell stress and differentiation**. 2004. Academic Dissertation Department of Pathology, University of Helsinki, Helsinki.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica**. 2. Porto Alegre: Artmed, 2007. ISBN 0-7817-2145-8.

THOMAS, J. A.; SCHLENDER, K. K.; LARNER, J. A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. **Anal Biochem**, v. 25, n. 1, p. 486-99, Oct 24 1968.

TORRES, I. L. et al. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 1, p. 111-6, Jan 2001.

TURNER, J. et al. Induction of the renal stanniocalcin-1 gene in rodents by water deprivation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 328, n. 1-2, p. 8-15, Oct 26 2010.

TURNER, J. et al. The renal stanniocalcin-1 gene is differentially regulated by hypertonicity and hypovolemia in the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 331, n. 1, p. 150-7, Jan 1 2011.

VAN LOON, L. J.; GOODPASTER, B. H. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. **Pflugers Arch**, v. 451, n. 5, p. 606-16, Feb 2006.

VARGHESE, R. et al. Overexpression of human stanniocalcin affects growth and reproduction in transgenic mice. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 868-76, Mar 2002.

VARGHESE, R. et al. Comparative analysis of mammalian stanniocalcin genes. **Endocrinology**, v. 139, n. 11, p. 4714-25, Nov 1998.

WAGNER, G. F. et al. Molecular cloning and cDNA sequence analysis of coho salmon stanniocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 90, n. 1, p. 7-15, Dec 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. 1, p. 31-9, Mar 1989.

WAGNER, G. F. et al. Immunological and biological evidence for a stanniocalcin-like hormone in human kidney. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 6, p. 1871-5, Mar 14 1995.

WAGNER, G. F. et al. Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius. **Gen Comp Endocrinol**, v. 63, n. 3, p. 481-91, Sep 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, n. 2, p. 315-22, Mar 1994.

WU, S.; YOSHIKO, Y.; DE LUCA, F. Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 5120-7, Feb 24 2006.

XIAO, L. J. et al. Expression and regulation of stanniocalcin 1 and 2 in rat uterus during embryo implantation and decidualization. **Reproduction**, v. 131, n. 6, p. 1137-49, Jun 2006.

YEUNG, B. H.; LAW, A. Y.; WONG, C. K. Evolution and roles of stanniocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 349, n. 2, p. 272-80, Feb 26 2012.

ZHANG, K. et al. Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 7, p. 3637-42, Mar 28 2000.