

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

**AÇÃO DOS HORMÔNIOS STANNIOCALCINAS 1 E 2 SOBRE OS FLUXOS
DA GLICOSE E DO GLICEROL NOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E
MARROM DE RATOS ALIMENTADOS E EM JEJUM**

ELAINE RENNER SARAPIO

Porto Alegre

2019

ELAINE RENNER SARAPIO

**AÇÃO DOS HORMÔNIOS STANNIOCALCINAS 1 E 2 SOBRE OS FLUXOS
DA GLICOSE E DO GLICEROL NOS TECIDOS ADIPOSOS BRANCO E
MARROM DE RATOS ALIMENTADOS E EM JEJUM**

*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 Doutor em Fisiologia.*

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientadora: Dra. Márcia Trapp

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço por tudo e a todos, meus dias foram muito melhores na companhia de vocês. Para sempre, levarei vocês em meu coração!

Roselis Silveira **Marcia Trapp** Luiz Kucharski Anapaula S. Vinagre

Luciano S. De Fraga Paulo Ivo H. Bittencourt Júnior **Alberto A. Rasia Filho**

Samir k. De Souza Jorge F. A. Model Débora S. Rocha

Rafael B. Fabres Maiza Von Dentz Everton Vogt Vitória Girelli

Matheus V. Lima Claudia Chiarel Jéferson F. Goularte

Grace V. Pardo Cinthia Scholer Thiago Henriques

Gabriela Biazus Renato Ramos Leonardo Furtado Marcia Simch

Tiago Perin Débora Solange Lara Régio Duarte Alex Ross

Alex Grossmann Gilcimar Lord Aline Nunes Clementina Schele Edi Paulus

Helgo Renner Deolina Renner

Doralina Iaremenco Olávio Sarapio

Claides Renner Sérgio Santos Claci Renner Nelson Conte

Clair Renner Leonildo Pinheiro Clarice Renner

Arnildo Sarapio Otávio Sarapio Carmem Sarapio Domingos Vieira

Iara Renner Cistiane Renner Rosa Gigoletti Marlei Portela

Carlos Machado Giovana Renner Henrique Renner Raquel Renner

Tauran R. Conte Camila Renner Ireno Scherer

Ivone Gasperin Gabriel Gasperin

Rex Capachão Joanhina Lobinha Erna Grace Ninho Ramona

Mimimimi

Pity Tchokonio

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

Dedico este trabalho aos meus tão queridos pais

José Sarapio e Selmita Renner Sarapio

RESUMO

O tecido adiposo (TA) é considerado um órgão endócrino que participa do mecanismo homeostático térmico, da regulação do peso corporal e da regulação do metabolismo dos carboidratos e de lipídios. O tecido adiposo marrom (TAM) oxida glicose e ácidos graxos (AG) para produzir calor na termorregulação, aumentando o gasto energético corporal, especialmente quando é estimulado em situações estressantes como o frio e jejum. O tecido adiposo branco (TAB) é especializado no armazenamento de energia na forma de triacilgliceróis (TAG) e secreta importantes adipocinas, como leptina e adiponectina, que influenciam processos como comportamento alimentar e sensibilidade e secreção de insulina. Além da regulação neuronal e metabólica, inúmeros hormônios e fatores parácrinos e autócrinos regulam o desenvolvimento, a manutenção e a função do TA. As stanniocalcinas (STCs) são hormônios glicoproteicos que foram descobertos em peixes e inicialmente relacionados ao metabolismo do cálcio. A família das STCs consiste de duas proteínas, STC-1 e STC-2, que são expressas em vários tecidos de mamíferos, como pâncreas, baço, rins, músculo esquelético e TA. A STC-1 contribui para a sobrevivência de células adiposas maduras, que perderam sua capacidade de renovação, sugerindo seu envolvimento com a homeostase do TAB. Em ratos *Wistar* machos alimentados, a STC-1 humana (hSTC-1) foi capaz de aumentar a lipogênese no TAB retroperitoneal, no entanto, diminuiu a incorporação de ^{14}C da glicose em lipídios totais no TAM. A STC-2 é expressa em diversos tipos de câncer e é considerada um hormônio sinalizador da progressão da doença, bem como, um fator anorexígeno. Desta forma o objetivo deste trabalho foi estudar o papel dos hormônios hSTC-1 e hSTC-2 sobre o metabolismo intermediário do TAM interescapular e TAB epididimal de ratos adultos, alimentados e em jejum de 48h. **Métodos:** Ratos *Wistar*

machos adultos (n = 120), foram randomicamente divididos em dois grupos: 1) animais alimentados, que receberam água e dieta padrão comercial para roedores *ad libitum*; 2) animais jejuados por 48 horas, que receberam água *ad libitum* e foram alojados individualmente. Os animais foram decapitados, o sangue troncular foi coletado, assim como os TAB e TAM foram excisados e utilizados nos experimentos *in vitro*. TAB e TAM do grupo controle foram incubados sem stanniocalcina (STC) com Krebs-Ringer-Bicarbonato pH 7,4 (KRB). O TAB foi incubado na presença de hSTC-1 e de hSTC-2 nas concentrações de 0,386 pM, 3,86 pM e 38,6 pM, diluídas em KRB. Para o TAM foi utilizada a concentração de 3,86 pM para hSTC-1 e hSTC-2, igualmente diluídas em KRB. Foram avaliadas a captação de 2- desoxi-glicose (2-DG), a oxidação de ^{14}C -glicose e a incorporação de ^{14}C -glicose e ^{14}C -glicerol em glicerol e ácido graxo em TAB e TAM. No TAM foram estimadas as expressões gênica das STCs 1 e 2, assim como a concentração de glicogênio e de lactato teciduais e a atividade da enzima hexocinase (HK). A análise estatística foi realizada conforme a natureza dos dados, obedecendo aos testes de normalidade e homocedasticidade, O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS sob o número de 27534. **Resultados e Discussão:** TAB - as STCs alteram a captação de glicose no TAB epididimal, tanto no estado alimentado como no jejum de 48h. Entretanto, as STCs não aumentaram a formação de glicerídeo-glicerol ou a síntese *de novo* de AG a partir de ^{14}C -glicose no TAB de ratos em jejum. Além disso, em ratos alimentados, a hSTC-2 aumentou significativamente a captação de glicose pelo TAB, mas diminuiu a formação de glicerídeo-glicerol. A hSTC-2 também diminuiu a fosforilação direta de glicerol no TAB de ratos alimentados, mas não afetou a síntese *de novo* de AG a partir de ^{14}C -glicerol. Assim, a hSTC-2 parece bloquear o efeito lipogênico no TAB. As STCs não alteraram a

oxidação de ^{14}C -glicose no TAB epididimal de ratos alimentados ou em jejum. Entretanto, no TAB retroperitoneal de ratos alimentados, a hSTC-1 aumentou em 85% a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose. Desta forma, as ações das STCs são distintas e tecido-específicas. **TAM** - Nosso estudo mostrou pela primeira vez a expressão da *Stc-1* e *Stc-2* em ratos alimentados e jejuados. A expressão da *Stc-2* é marcadamente maior nos ratos em jejum do que nos alimentados. Assim, a hSTC-1, estimulando a captação de glicose no TAM de ratos alimentados, exerce uma função de hormônio hipoglicemiante. O aumento da captação de glicose no TAM induzida pela hSTC-1 no estado alimentado não foi acompanhado pela ativação da oxidação de glicose, da síntese de glicerol-3-P, da lipogênese *de novo* a partir de ^{14}C -glicose ou do aumento da concentração de glicogênio. A hSTC-2 não aumenta a captação da glicose ou altera a atividade das vias envolvidas na síntese de glicerol-3-P ou a lipogênese *de novo* a partir de ^{14}C -glicose ou de ^{14}C -glicerol no TAM de ratos alimentados. Além disso, nem a hSTC-1 ou a hSTC-2 alteraram a atividade da HK. Todavia, a hSTC-2 diminuiu de forma significativa a concentração de glicogênio no TAM de ratos alimentados, mantendo sem alterações os níveis de lactato no tecido e a capacidade de oxidação da glicose neste órgão. A diminuição do glicogênio pela hSTC-2 pode levar a uma ação deletéria neste órgão, como diminuição na capacidade termogênica, na esterificação de AG entre outras funções deste tecido. **Conclusão:** as STCs apresentaram um papel importante na captação de glicose e nos estoques de glicogênio do TAB e TAM de ratos alimentados e jejuados. Estes achados evidenciam o papel das STCs sobre a regulação do metabolismo intermediário em mamíferos e podem ser hormônios promissores no desenvolvimento de novos hipoglicemiantes.

ABSTRACT

Adipose tissue (AT) is considered an endocrine organ that participates in the homeostatic thermal mechanism, the regulation of body weight and the regulation of the metabolism of carbohydrates and lipids. Brown adipose tissue (BAT) oxidizes glucose and fatty acids (FA) to produce heat in thermoregulation, increasing body energy expenditure, especially when it is stimulated in stressful situations such as cold and fasting. White adipose tissue (WAT) is specialized in storage of energy in the form of triacylglycerols (TG) and secretes important adipokines, such as leptin and adiponectin, which influence processes including eating behavior and insulin sensitivity and secretion. In addition to neuronal and metabolic regulation, innumerable hormones, as well as paracrine and autocrine factors, regulate the development, maintenance and function of AT. Stanniocalcins (STCs) are glycoprotein hormones that have been discovered in fish and are initially related to calcium metabolism. The STC family consists of two proteins, STC-1 and STC-2, which are expressed in various mammalian tissues such as pancreas, spleen, kidneys, skeletal muscle and AT. STC-1 contributes to the survival of mature adipose cells, which have lost their capacity for renewal, suggesting their involvement with WAT homeostasis. In male Wistar rats, human STC-1 (hSTC-1) was able to increase lipogenesis in the retroperitoneal WAT. However, it decreased the incorporation of ^{14}C from glucose into total lipids in the BAT. STC-2 is expressed in several types of cancer and is considered a hormone that signals the progression of the disease, as well as an anorectic factor. Thus, the objective of this work was to study the effect of hSTC-1 and hSTC-2 hormones on the intermediate metabolism of interscapular BAT and epididymal WAT of fed and 48h-fasted adult rats. **Methods:** Adult male Wistar rats (n = 120) were randomly divided into two groups: 1) fed animals, which received

water and commercial standard diet for rodents *ad libitum*; 2) animals fasted for 48 hours, given water *ad libitum* and housed individually. The animals were decapitated, trunk blood was collected, and WAT and BAT were excised and used in the *in vitro* experiments. WAT and BAT from the control group were incubated without stanniocalcin (STC) with Krebs-Ringer-Bicarbonate, pH 7.4 (KRB). WAT was incubated in the presence of hSTC-1 and hSTC-2 at the concentrations of 0.386 pM, 3.86 pM and 38.6 pM, diluted in KRB. For BAT, the concentration of 3.86 pM was used for hSTC-1 and hSTC-2, equally diluted in KRB. The uptake of 2-deoxyglucose (2-DG), the oxidation of ^{14}C -glucose, as well as the incorporation of ^{14}C -glucose and ^{14}C -glycerol into glycerol and fatty acid were evaluated in WAT and BAT. In BAT, the gene expression of STCs 1 and 2, the concentration of tissue glycogen and lactate, as well as the activity of hexokinase (HK) were estimated. Statistical analysis was performed according to the tests of normality and homoscedasticity. The present study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at UFRGS under the number of 27534. **Results and Discussion:** **WAT** - STCs alter the glucose uptake in the epididymal WAT, both in fed state and in 48h fasting. However, STCs did not increase glyceride-glycerol formation or *de novo* synthesis of FA from ^{14}C -glucose in the WAT of fasted rats. In addition, in fed rats, hSTC-2 significantly increased glucose uptake by the WAT, but decreased glyceride-glycerol formation. hSTC-2 also decreased the direct phosphorylation of glycerol in the WAT of fed rats, but did not affect the *de novo* synthesis of FA from ^{14}C -glycerol. Thus, hSTC-2 appears to block the lipogenic effect in WAT. STCs did not alter ^{14}C -glucose oxidation in the epididymal WAT of fed or fasted rats. However, in the retroperitoneal WAT of fed rats, hSTC-1 increased the production of $^{14}\text{CO}_2$ from ^{14}C -glucose by 85%. Thus, the actions of STCs are distinct and tissue-specific. **BAT** - Our study showed, for the first

time, the expression of *Stc-1* and *Stc-2* in fed and fasted rats. Expression of *Stc-2* is markedly greater in fasted than in fed rats. Thus, hSTC-1, stimulating the uptake of glucose in the BAT of fed rats, works as a hypoglycemic hormone. The increase in glucose uptake in BAT, induced by hSTC-1 in the fed state, was not accompanied by the activation of glucose oxidation, glycerol-3-P synthesis, *de novo* lipogenesis from ¹⁴C-glucose or by increased concentration of glycogen. hSTC-2 does not increase glucose uptake or alter the activity of the pathways involved in glycerol-3-P synthesis or *de novo* lipogenesis from ¹⁴C-glucose or ¹⁴C-glycerol in the BAT of fed rats. In addition, neither hSTC-1 nor hSTC-2 altered HK activity. However, hSTC-2 significantly decreased the glycogen concentration in the TAM of fed rats, maintaining unchanged lactate levels in the tissue and the glucose oxidation capacity in this organ. The decrease of glycogen by hSTC-2 may lead to a deleterious action in this organ, such as a decrease in thermogenic capacity and in the esterification of FA, among other functions of this tissue. **Conclusion:** STCs played an important role in the uptake of glucose and glycogen stores in the WAT and BAT of fed and fasted rats. These findings highlight the role of STCs in the regulation of intermediary metabolism in mammals, and may be promising hormones in the development of new hypoglycemic agents.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| 2-DG | 2- ¹⁴ C- desoxi-glicose |
| AG | Ácido graxo |
| AGL | Ácidos graxos livres |
| AMPc | Monofosfato cíclico de adenosina |
| AMPK | Proteína cinase ativado por AMP |
| AQP7 | Aquaporina 7 |
| ATGL | Lipase de triacilglicerol do adipócito |
| ATP | Trifosfato adenosina |
| BSA | Albumina do soro bovino |
| C/EBP α | Proteína ligante ao amplificador CCAAT alfa |
| C/EBP β | Proteína ligante ao amplificador CCAAT beta |
| CD36 | Cluster de diferenciação 36 |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| CoA | Coenzima A |
| CS | Corpúsculos de Stannius |
| DM1 | Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 |
| DM2 | Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FABPpm | Proteína de ligação de ácidos graxos da membrana plasmática |
| FAT | Translocase de ácidos graxos |
| FATP1 | Proteína transportadora de ácidos graxos 1 |
| FATP4 | Proteína transportadora de ácidos graxos 4 |
| FGF21 | Fator de crescimento de fibroblastos 21 |
| G6P | Glicose 6 fosfato |
| GK | Glicerocinase |

| | |
|---------------|--|
| Glicerol-3-P | Glicerol -3- fosfato |
| GLUT-1 | Transportador de glicose tipo 1 |
| GLUT-4 | Transportador de glicose tipo 4 |
| GP | Glicogênio fosforilase |
| GP a | Glicogênio fosforilase a |
| GP b | Glicogênio fosforilase b |
| HK | Hexocinase |
| HK I | Hexocinase tipo 1 |
| HK II | Hexocinase tipo 2 |
| hSTC-1 | Stanniocalcina humana 1 |
| hSTC-2 | Stanniocalcina humana 2 |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 |
| IL-6 | Interleucina- 6 |
| KRB | Krebs-Ringer Bicarbonato |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| LHS | Lipase hormônio sensível |
| MAMs | Membranas do retículo endoplasmático associadas às mitocondriais |
| MCT1 | Transportador de monocarboxilato 1 |
| MCT4 | Transportador de monocarboxilato 4 |
| Myf5 | Fator miogênico 5 |
| PEPCK | Fosfoenolpiruvato carboxicinase |
| PDH | Piruvato desidrogenase |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PhK | Fosforilase cinase |
| PKA | Proteína cinase A |
| POMC | Pró-opiomelanocortina |
| PPAR γ | Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma |

| | |
|-------|--|
| RE | Retículo endoplasmático |
| RNAm | Ácido ribonucleico mensageiro |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SOCE | Entrada de cálcio operada por estoque |
| STC | Stanniocalcina |
| STIM1 | Molécula de interação estromal 1 |
| TA | Tecido adiposo |
| TAB | Tecido adiposo branco |
| TABG | Tecido adiposo bege |
| TAG | Triacilglicerol |
| TAM | Tecido adiposo marrom |
| UCP-1 | Proteína desacopladora 1 |
| VLDL | Lipoproteínas de densidade muito baixa |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da localização do Corpúsculo de *Stannius*

Figura 2: Desenho experimental do estudo

Figura 3: Concentrações dos hormônios hSTC-1 e hSTC2

Figura 4: Resumo esquemático do artigo 1

Figura 5: Resumo esquemático do artigo 2

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1. O Tecido Adiposo | 16 |
| 1.2. O Tecido Adiposo Branco | 16 |
| 1.3. O Tecido Adiposo Marrom | 24 |
| 1.4. O Tecido Adiposo Bege | 27 |
| 1.5. As Stanniocalcinas | 27 |
| 2. OBJETIVOS | 33 |
| 2.1. Objetivo geral | 33 |
| 2.2. Objetivos específicos | 33 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 4. RESULTADOS | 46 |
| 4.1 Artigo 1 | 46 |
| 4.2 Artigo 2 | 47 |
| 5. DISCUSSÃO | 48 |
| 6. CONCLUSÃO | 59 |
| 7. PERSPECTIVAS | 63 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |
| ANEXO I- Comprovante de aprovação ética do estudo | 77 |
| ANEXO II -Artigos completos | 78 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. O tecido adiposo

O armazenamento de energia na forma de lipídios é um mecanismo altamente conservado ao longo da evolução, ocorrendo tanto em invertebrados quanto em vertebrados (ZWICK et al., 2018). Em mamíferos, os lipídios são armazenados no tecido adiposo (TA) que participa da manutenção da homeostasia térmica, da regulação do peso corporal e da regulação do metabolismo da glicose e de lipídios. O tipo de célula predominante no TA é o adipócito, também chamado de célula adiposa ou célula de gordura (LUO & LIU, 2016). O TA é altamente heterogêneo em relação à localização e função. Três tipos de TA são encontrados em mamíferos: tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo bege (TABG) e tecido adiposo marrom (TAM) (WU et al., 2013; PROENÇA et al., 2014; ZHANG et al., 2018).

1.2. O tecido adiposo branco

O TAB é amplamente distribuído em mamíferos, podendo estar em volta, ou mesmo infiltrado em órgãos e estruturas internas. É composto por adipócitos, pré-adipócitos (células precursoras de adipócitos), células endoteliais vasculares, pericitos, células do estroma vascular, fibroblastos, leucócitos e macrófagos (BASU et al., 2011; TCHKONIA et al., 2013).

Em mamíferos, os depósitos de TAB são anatomicamente classificados como TAB subcutâneo e TAB visceral (ZWICK et al., 2018). O TAB subcutâneo é principalmente representado pelos depósitos abaixo da pele nas regiões abdominal, gluteal e femoral sendo relacionado clinicamente por conferir alguns efeitos benéficos

sobre o metabolismo. O TAB visceral se refere ao tecido depositado próximo ou mesmo no interior das vísceras da cavidade abdominal, bem exemplificado pelas gorduras mesentérica, retroperitoneal, pericárdica e gonadal. Os depósitos adiposos perigonadais, como o epididimal são os maiores encontrados em roedores (CHUSYD et al., 2016). São comumente associados aos distúrbios metabólicos, como diabetes e doenças cardiovasculares (ZWICK et al., 2018; ZHANG et al., 2018). O fluxo sanguíneo no TAB é relativamente baixo em comparação aos outros tecidos, sendo ligeiramente maior no TAB visceral do que no TAB subcutâneo (TCHKONIA et al., 2013). Mecanismos celulares autônomos ditam diferenças específicas de depósito na fisiologia dos adipócitos, e todos os depósitos expressam assinaturas gênicas específicas (ROSEN & SPIEGELMAN, 2014). Nos adipócitos viscerais, o efeito lipolítico das catecolaminas é mais intenso comparado ao efeito nos adipócitos subcutâneos, devido à presença de maior quantidade de receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos na superfície celular (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Além da visão clássica da função dos adipócitos brancos como reserva energética e como isolante térmico, o TAB despertou o interesse de pesquisadores do mundo inteiro devido à notável capacidade de produzir e de secretar substâncias bioativas como a leptina, a adiponectina, a interleucina-6 (IL-6) e as demais adipocinas (PROENÇA et al., 2014). Atualmente, este tecido é considerado um órgão endócrino dinâmico que participa da homeostase energética, regula o comportamento alimentar, altera a sensibilidade celular à insulina e à resposta inflamatória (WU et al., 2013).

O adipócito branco armazena triacilglicerol (TAG) em uma única e grande gota lipídica unilocular, recoberta por uma monocamada de fosfolipídios e de proteínas

associadas – as perilipinas (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; KIMMEL et al., 2016). A quantidade de TAG armazenado no TAB é dependente do balanço entre as velocidades de síntese (lipogênese) e de degradação (lipólise). Em períodos de gasto energético, como durante o jejum ou o exercício físico, a lipólise é estimulada. Em contraste, após a ingestão alimentar, no período pós-prandial, a lipogênese no TAB é estimulada (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Sob condições como jejum e exercício físico, os TAB visceral e subcutâneo sofrem lipólise e liberam ácidos graxos livres e glicerol na corrente sanguínea, para serem usados pelos tecidos periféricos na produção de energia. O controle da lipólise no TAB envolve a interação de diversos fatores, sendo que a mobilização dos estoques de TAGs é regulada por hormônios e requer a ativação das enzimas lipolíticas (RODRIGUEZ et al., 2015).

A lipólise ocorre durante o período de baixa circulação de insulina e sob estimulação hormonal das catecolaminas, através de β -adrenoceptores lipolíticos (β_1 , β_2 e β_3) e peptídeos natriuréticos (RODRIGUEZ et al., 2015). As catecolaminas são as ativadoras primárias da mobilização de ácidos graxos (AG) do TAB induzidas pelo jejum e outros tipos de estresse (PROENÇA et al., 2014). A noradrenalina, ligando-se aos receptores β -adrenérgicos, os quais são acoplados às proteínas G na membrana plasmática dos adipócitos, transmite o sinal estimulador à enzima adenilato ciclase, a qual catalisa a conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (ZECHNER et al., 2009). O AMPc gerado se liga à proteína cinase dependente de AMPc (PKA), ativando-a pela dissociação das subunidades regulatórias e catalíticas. Uma vez estimulada, a PKA juntamente com outras cinases dependentes de serina fosforilam a lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL) e a lipase hormônio sensível (LHS), induzindo sua ativação e, subsequentemente, a

translocação de ambas as enzimas do citosol para a gota de gordura, desencadeando a hidrólise dos TAGs estocados. A ATGL inicia a lipólise removendo especificamente o primeiro ácido graxo do TAG, então o diacilglicerol resultante é hidrolisado pela LHS (WATT et al., 2010; NIELSEN et al., 2014). O TAB secreta quantidades significativas de glicerol durante a lipólise. O glicerol livre não é utilizado pelo TAB em quantidades significativas, nem para a lipogênese nem como substrato energético, tampouco é reciclado em proporções significativas para glicerol-3-fosfato (ROTONDO et al., 2017). O principal transportador de glicerol do TAB, a aquaporina 7, limita acentuadamente o processo, facilitando sua rápida excreção, evitando assim, a significativa reciclagem intracelular. A AQP7 é um canal de glicerol nos adipócitos que previne o aumento agudo da pressão osmótica intracelular quando a produção de glicerol aumenta rapidamente durante a lipólise (HIBUSE et al., 2006). Entretanto, a enzima glicerocinase (GK) que está presente com baixa atividade no TAB, tende a aumentar em obesos e sob dietas ricas em lipídios (ROTONDO et al., 2017).

As perilipinas, proteínas que recobrem a superfície da gota lipídica nos adipócitos brancos, têm a função de proteção contra a hidrólise. Entre os vários tipos de perilipinas já identificadas, a perilipina 1 é a proteína mais abundante na superfície das gotículas lipídicas. Estas proteínas, quando fosforiladas pela PKA durante o estímulo lipolítico, sofrem modificação conformacional permitindo assim o acesso da ATGL e da LHS à gota de gordura (DUNCAN et al., 2007; TCHKONIA et al., 2013).

O excesso de energia é eficientemente depositado na forma de triacilgliceróis neutros no TAB pela via lipogênica (LUO & LIU, 2016). Durante o processo de lipogênese, o adipócito necessita de uma fonte de glicerol-3-P e de ácidos graxos livres complexados com coenzima A (CoA), constituindo o composto acil-CoA para a formação dos triacilgliceróis. O glicerol livre circulante resulta da lipólise, derivado

da dieta ou reabsorvido nos túbulos renais proximais (RODRIGUEZ et al., 2015). O glicerol intracelular é obtido como glicerol-3-fostato pela via glicolítica, gliceroneogênese e pela fosforilação do glicerol pela enzima GK. A produção de glicerol-3-P requer a captação de glicose, o que envolve proteínas transportadoras específicas, *glucose transporters family* (GLUTs) como os GLUT-1 e GLUT-4. A insulina estimula a captação da glicose via GLUT-4. Além disso, o ritmo de metabolização da hexose é acelerado pela insulina, gerando mais glicerol-3-P (PROENÇA et al., 2014; FONSECA-ALANIZ et al., 2006). A obtenção de glicerol-3-P pela via gliceroneogênica, consiste na formação de glicerol-3-P a partir de compostos não glicídicos, como aminoácidos, lactato e piruvato, envolvendo a carboxilação do piruvato a oxaloacetato, descarboxilação do oxaloacetato a fosfoenolpiruvato e a formação de glicerol-3-P por uma reversão parcial da via glicolítica (PROENÇA et al., 2014).

Os AGs que formam os TAGs podem ter diferentes origens: 1) sintetizados *de novo* a partir da glicose ou de outros compostos produtores de acetil-CoA (como alguns aminoácidos); 2) esterificados pelo tecido, podendo ser provenientes da hidrólise dos TAGs endógenos ou captados dos quilomícrons circulantes provenientes da absorção intestinal; 3) oriundos das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), secretadas pelo fígado (HOLM, 2003).

Parte do fluxo de metabólitos da via glicolítica segue em direção à formação de piruvato que, transportado para o interior da mitocôndria é convertido em acetil-CoA pela ação da piruvato desidrogenase (PDH). A acetil-CoA é conjugada ao oxaloacetato, pela ação da citrato sintase, gerando citrato. Parte do citrato é transportado de volta ao citoplasma, onde sofre a ação da enzima ATP-citrato liase,

regenerando acetil-CoA, a qual é carboxilada pela enzima acetil-CoA carboxilase, produzindo malonil-CoA. Este último produto entra na complexa via de síntese de ácidos graxos, catalisada pela enzima ácido graxo sintase, culminando na formação de acil-CoA, o qual pode esterificar o glicerol-3-P, completando a biossíntese de TAG. Nesse contexto, finalmente, TAG lipídio pode ser incorporado à gotícula citoplasmática de gordura (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Além da captação de glicose, os adipócitos captam ácidos graxos livres. A insulina ativa a lipase lipoproteica no endotélio do tecido adiposo (PETERSEN & SHULMAN et al., 2018). Vários transportadores de AGs são expressos na membrana, como a translocase de ácidos graxos (CD36/FAT), a proteína de ligação de ácidos graxos da membrana plasmática (FABP pm), as caveolinas 1 e 2, a proteína transportadora de ácidos graxos (FATP1 e 4) e a sintetase acil-CoA de cadeia longa. A captação de ácidos graxos pelos adipócitos ocorre tanto por processos mediados por difusão, quanto por meio de proteínas dependentes de ATP (DUBIKOVSKAYA et al., 2014; THOMPSON et al., 2010; SCHWENK et al., 2010; LOBO et al., 2007). CD36 é um dos principais transportadores de membrana de ácidos graxos. Estas proteínas transportam AGs da membrana celular para o local de ação da enzima acil-CoA sintase, onde os AGs são esterificados com CoA para formar acil-CoA e finalmente serem esterificados com glicerol-3-P no retículo endoplasmático (RE) (PROENÇA et al., 2014).

A lipogênese *de novo* é uma via integrante da lipogênese no metabolismo do TAB de ratos. Ela utiliza substratos não lipídicos, como a glicose, para a síntese de glicerol-3-P e piruvato que levam a síntese de TAG nos adipócitos. A glicose é transportada para dentro do adipócito pelo GLUT-4 dependente de insulina. O piruvato é utilizado na formação de acetil-CoA que é carboxilada pela enzima acetil-CoA carboxilase em

malonil CoA. A ácido graxo sintase, enzima chave da lipogênese *de novo*, converte a malonil-CoA em palmitato, que é o primeiro produto de ácido graxo. Finalmente, o palmitato sofre as reações de alongamento e dessaturação para gerar ácidos graxos complexos, incluindo o ácido esteárico, o ácido palmitoleico e o ácido oleico que são subsequentemente esterificados com glicerol-3-P para formar TAG (PROENÇA et al., 2014; SONG et al., 2018).

Os adipócitos estão sujeitos a vários tipos de regulação, incluindo neuronal, endócrina e metabólica. O sistema nervoso autônomo tem conexões neurais simpáticas e parassimpáticas com os depósitos de gordura, controlando o metabolismo e liberação hormonal do TAB (CARMEAN et al., 2014). A inervação simpática no TAB modula tanto a produção de hormônios (por exemplo, a expressão da leptina) quanto a lipólise durante o jejum. Já, a inervação parassimpática aumenta consideravelmente a sensibilidade à insulina (FLIERS et al., 2003). Embora a insulina seja o regulador endócrino clássico do metabolismo lipídico no tecido adiposo, outros importantes hormônios endócrinos também controlam a fisiologia do tecido adiposo (Tabela 1). Muitos desses hormônios produzidos pelo TAB atuam em órgãos distantes, especialmente no SNC, afetando o comportamento alimentar, o balanço energético e a sensibilidade hormonal (FLIERS et al., 2003). A leptina é produzida pelos adipócitos e é fundamental para a homeostase energética e controle do peso corporal. Tanto a leptina quanto a insulina podem atuar em neurônios hipotalâmicos, controlando a homeostase energética (DODD et al., 2015). A insulina participa do processo de adipogênese e lipogênese e é o hormônio antilipolítico mais importante (HOLM, 2003; TCHKONIA et al., 2013). A insulina aumenta a captação de glicose nos adipócitos através do estímulo de síntese e da translocação do transportador de glicose GLUT-4 (transportador de glicose/hexose de difusão facilitada independentes do sódio) do citosol para a

membrana. Além disso, ativa enzimas lipogênicas e glicolíticas (como a hexocinase II – HK II), mediante modificação covalente, estimulando a lipogênese. A glicose captada pelos adipócitos é convertida em intermediários, os quais são utilizados para produção de TAG (RUI, 2017). O glucagon é um hormônio contrarregulador da insulina, ele tem efeitos hipolipemiantes e saciantes. No TAB, estimula a atividade da LHS, resultando em um aumento da concentração de ácidos graxos livres e glicerol na circulação (HABEGGER et al., 2010).

Tabela 1. Receptores hormonais no TAB (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

| Receptor Hormonal | Principais efeitos biológicos |
|---|---|
| Leptina | (+) Lipólise e oxidação lipídica |
| Insulina | (+) Lipogênese e captação de glicose e (-) lipólise |
| Glicocorticóides | (+) Lipólise |
| Glucagon | (+) Lipólise |
| Catecolaminas | (+) Lipólise |
| T ₃ e T ₄ | (+) Lipólise |
| Esteróides sexuais | Regulam desenvolvimento do adipócito |
| IGF 1 (fator de crescimento insulina-símile) | (+) Adipogênese |
| GH (hormônio de crescimento) | (+) Lipólise |
| Prostaglandinas | (-) Lipólise |
| TNF- α (Fator de necrose tumoral α) | (+) Lipólise e aumenta resistência à insulina |
| IL-6 (interleucina - 6) | (-) LPL, (+) Lipólise |
| Adenosina | (-) Lipólise e (+) captação de glicose |
| Adiponectina | (+) sensibilidade à insulina |
| Gastrina | Regula a expressão de leptina |
| CCK (Colecistocinina) | Regula a expressão de leptina |
| GIP (Peptídeo gastro-inibidor) | (+) síntese de AGL e TAG |
| GLP1 (Peptídeo glucagon-símile 1) | (+) síntese de ácidos graxos |
| ASP (Proteína estimuladora de acilação) | (+) síntese de TAG |
| ANP (Peptídeo natriurético atrial) | Modula o metabolismo de glicose |
| Angiotensina II | (+) Lipogênese, induz resistência à insulina |
| Bradicinina | Aumenta a sensibilidade à insulina |
| EGF (Fator de crescimento epidermal) | Regula a diferenciação de adipócitos |
| TGF β (Fator transformador de crescimento β) | Bloqueia a diferenciação de adipócitos |
| Melatonina | Sinergiza a ação da insulina |

1.3. O tecido adiposo marrom

O TAM está presente em mamíferos e se estima que tenha surgido há cerca de 150 milhões de anos (ENERBACK et al., 2010). Em humanos, o TAM foi considerado por muitos anos um tecido ativo apenas em recém-nascidos. Contudo, está bem estabelecido na literatura que depósitos substanciais de gordura marrom podem ser detectados nas regiões supraespinhal, supraclavicular, pericárdica, perirrenal e cervical de humanos adultos (CYPESS et al. 2009, LEE et al., 2016). De modo similar, em ratos o TAM é encontrado na região interescapular, supraclavicular, periaórtica, perirenal, ventro espinhal e axilar (ZHANG et al., 2018).

O TAM dissipa a energia química armazenada em TAGs na forma de calor para preservar a temperatura corporal durante a hipotermia (ROSEN & SPIEGELMAN, 2014). Os adipócitos marrons contêm alta densidade de mitocôndrias com altas concentrações de proteína desacopladora 1 (UCP-1). A UCP-1 é um canal de prótons presente na membrana mitocondrial interna que, quando ativada, permite que os prótons carregados de energia vazem através da membrana mitocondrial. Desse modo, desacopla a fosforilação oxidativa da síntese de ATP e a célula dissipa energia química na forma de calor (RUI, 2017).

A termogênese no TAM está primordialmente sob o controle do sistema nervoso simpático. A exposição ao frio, por exemplo, estimula a liberação de noradrenalina nos terminais simpáticos aumentando a atividade termogênica do TAM (CANNON & NEDERGAARD, 2004). Todas as células adiposas marrons são envolvidas por uma rede delicada de terminais adrenérgicos, sendo que o receptor β_3 adrenérgico o que predominante. A hidrólise dos TAGs ocorre da mesma forma

sequencial que no TAB, porém o TAM é revestido pelas perilipinas 1, 2 e 5 (RUI, 2017). A noradrenalina ativa a cascata de sinalização AMPc/PKA, aumentando a expressão de genes termorregulatórios e a lipólise pela fosforilação da ATGL e LHS (DE MEIS, 2003; GIRALT & VILLARROYA, 2013). A noradrenalina liberada pelos terminais simpáticos é o mais potente estimulador do TAM, embora este tecido possa também ser regulado por hormônios, tais como insulina, glicocorticoides e hormônios tireoidianos (HIMMS-HAGEN, 1989).

O TAM apresenta grande quantidade de lipídios armazenados, porém, diferentemente do TAB, este tecido utiliza a reserva lipídica para a produção de calor, ao invés de exportá-la para o sangue (DE MEIS, 2003). A insulina estimula a lipogênese, a expressão da UCP-1 e a termogênese (VALVERDE et al., 2003; RUI, 2017). A captação de glicose é mediada pelos GLUT1 e GLUT4, a captação de ácidos graxos ocorre via CD36 e a proteína transportadora de ácidos graxos-1 (FATP1). A glicose captada é fosforilada à glicose-6-fosfato (G6P) pela enzima glicolítica HK que possui duas isoformas expressas no TAM, HK 1 e 2. A glicose captada pode seguir para formação de glicogênio ou para a via lipogênica (CARMEAN et al., 2016). O papel da lipogênese no TAM é manter estoques adequados de TAGs para a termogênese (RUI, 2017). Os ácidos graxos derivados dos TAGs são a principal fonte de energia para a termogênese no TAM. A ativação de adipócitos marrons leva à lipólise das gotículas lipídicas intracelulares preenchidas com TAG e a subsequente liberação de AGs. Esses AGs servem a dois propósitos: 1) são metabolizados por enzimas da β -oxidação na matriz mitocondrial; e 2) ativam a UCP-1, que então gera calor, iniciando um ciclo fútil de transporte de elétrons na cadeia respiratória, usando os elétrons derivados da β -oxidação. Posteriormente, o reabastecimento dos estoques intracelulares de TAG ocorre de três maneiras: 1) captação de ácidos graxos livres (AGL) ligado à albumina, 2)

captação de AG da lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícrons, e 3) captação de glicose seguida pela lipogênese *de novo*. A captação de glicose pelo TAM é mediada por mecanismos dependentes e independentes da insulina (CANNON & NEDERGAARD, 2004; LABBÉ et al., 2015). A glicose também é usada pelo TAM para geração de ATP via da glicólise (THOONEN et al., 2016).

Procedimentos de desnervação simpática em camundongos comprovaram a conexão entre o hipotálamo e o TAM. A desnervação promove uma redução significativa do índice de utilização de glicose pelo tecido, indicando que o sistema nervoso simpático é o principal responsável pela regulação da utilização de glicose no TAM desses animais (CHAVES et al., 2008).

A composição da dieta, assim como o estímulo simpático clássico, é um dos fatores que pode 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 (GIRALT & VILLARROYA, 2013).

O TAM também está envolvido com o *cleareance* dos triacilgliceróis plasmáticos e com a homeostase da glicose (BARTELT et al., 2011). GUERRA et al. (2001) utilizaram ratos com deficiência de receptores de insulina no TAM e observaram que além da atrofia do TAM, ocorriam alterações na homeostase da glicose, como por exemplo, hiperglicemia em jejum e resistência periférica à insulina.

Os fatores metabólicos derivados do TAM estão ganhando cada vez mais atenção por suas atividades antiobesidade, anti-hiperglicemia e/ou resistência à insulina (VILLARROYA et al., 2013; RUI, 2017). O TAM secreta uma série de adipocinas. Devido ao seu pequeno tamanho em relação ao TAB, os níveis circulantes dessas

adipocinas são menores (PROENÇA et al., 2014). Por isso, é improvável que o TAM seja uma fonte importante de leptina circulante e adiponectina em humanos. Além disso, os adipócitos marrom e bege secretam várias adipocinas específicas, incluindo neuregulina-4, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento de fibroblastos 21 (FGF21) e IL-6 (VILLARROYA et al., 2013). A neuregulina-4 suprime a lipogênese hepática como um hormônio endócrino. O FGF21 e a IL-6 promovem a termogênese em adipócitos marrom e bege de forma parácrina/autócrina. Acredita-se que o IGF-1 esteja envolvido na redução da hiperglicemia em camundongos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), devido à ativação da captação de glicose pelo TAM (RUI 2017).

1.4. O tecido adiposo bege

Existem dois tipos de células adiposas termogênicas em mamíferos: o TAM e o tecido adiposo bege (TABG). Ao contrário do TAM, que possui a mesma origem embriológica das células musculares - fator mio gênico 5 (Myf5), as células adiposas beges emergem de depósitos do TAB (WU et al., 2013). O TABG pode ser formado a partir de depósitos de TAB subcutâneo quando estes são estimulados pelo frio, através da via simpática. O TABG apresenta níveis elevados de UCP-1 na membrana mitocondrial e aparência multilocular (BOSTROM et al., 2012). Devido à capacidade termogênica, tanto o TAM quanto o TABG possuem o papel de aumentar o gasto energético do organismo (RUI, 2017).

1.5. Stanniocalcinas

As stanniocalcinas (STC) são hormônios glicoproteicos compostos pelas

proteínas STC-1 e STC-2 cujas sequências de aminoácidos são altamente conservadas entre os vertebrados (CHANG et al., 1995, OLSEN et al., 1996).

Em 1839 o anatomista alemão Hermann Friedrich Stannius, estudando esturjões (peixes ósseos), identificou um par de glândulas adjacentes aos rins (Figura 1) as quais batizou de Corpúsculos de Stannius (CS). Stannius acreditava se tratar das glândulas adrenais dos peixes. Em 1964, M. Fontaine descreveu que os CS eram responsáveis pelo controle dos níveis de cálcio no sangue de peixes. Após 10 anos, PANG & PANG (1974) relataram que os CS secretavam um fator que reduzia os níveis de cálcio circulantes, ação similar ao hormônio calcitonina e o nomeou de hipocalcina (PANG & PANG, 1974). Posteriormente a hipocalcina passou a se chamar stanniocalcina e se viu que a remoção cirúrgica dos CS levava ao aumento nos níveis séricos de cálcio, sugerindo um papel anti-hipercalcêmico (FONTAINE, 1964; SO & FENWICK, 1979; LAFEVER & PERRY, 1988). Em peixes, o aumento dos níveis plasmáticos de cálcio estimula a síntese e a secreção de STC pelos CS, o que reduz a hipercalcemia ao diminuir a absorção de cálcio nas brânquias e no intestino, aumentando a reabsorção de fosfato nos túbulos proximais renais (WAGNER et al., 1994).

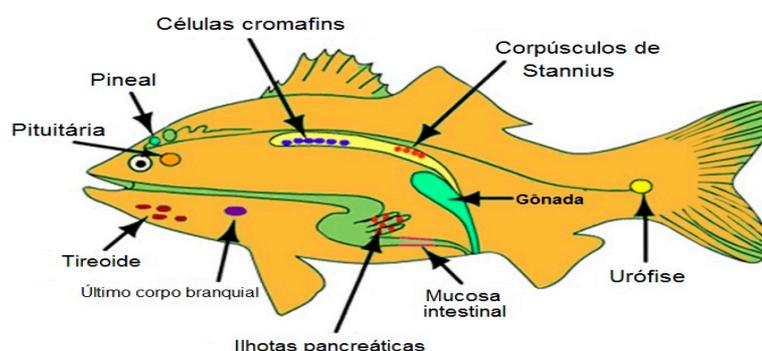


Figura1: Localização do Corpúsculo de Stannius em peixes (WAGNER et al. (1994)).

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. Contudo, o gene que codifica a proteína STC-1 de mamíferos foi identificado e clonado em 1995 em rins humanos e em cultura de fibroblastos brônquicos (WAGNER et al., 1995; CHANG et al., 1995; OLSEN et al., 1996). A STC-1 possui 247 aminoácidos e é expressa em uma ampla variedade de células como neurônios, células tubulares renais, adipócitos e em órgãos como ovários, adrenais, próstata e coração entre outros (CHANG et al., 1995). A STC em peixes atua na homeostase mineral como um hormônio anti-hipercalcêmico (OLSEN et al., 1996; PALMA et al., 2019). Em alguns tecidos de mamíferos essa característica se manteve, como nas células renais, cardiomiócitos e algumas áreas do sistema nervoso (ZHANG et al., 2000).

Evidências atuais mostraram o envolvimento da STC-1 nos processos de crescimento tumoral e apoptose em vários tipos de câncer como coloretal, hepático, mama, ovário, cerebral, pulmão e renal (LEUNG & WONG, 2018; LI et al., 2018). Camundongos transgênicos que superexpressavam STC-1 no músculo esquelético apresentaram hiperfagia, perda de peso, maior consumo de oxigênio, aumento na rapidez de depuração da glicose e, curiosamente, aumento de tamanho das mitocôndrias (FILVAROFF et al., 2002). Outros trabalhos também demonstraram que a STC-1 é responsável pelo aumento no tamanho das mitocôndrias sem prejudicar a integridade dessas organelas (AMEMIYA et al., 2002; MCCUDDEN et al., 2002; ELLARD et al., 2007). Estes estudos sugerem que a STC-1 pode ter como alvo as mitocôndrias para regular o metabolismo celular. Um possível receptor para STC-1 foi descrito nas células luteais de camundongos (PACIGA et al., 2003). Sítios de ligação para a STC-1 tanto na membrana plasmática quanto nas mitocôndrias foram

identificados em células renais e hepáticas de camundongos (PACIGA et al., 2003). O sequestro de STC-1, por estas células, parece ser um processo mediado por receptores, em primeiro lugar com a sua entrada inicial na célula e, em seguida, o seu subsequente deslocamento para as mitocôndrias (MCCUDDEN et al., 2002). Esses achados sustentam a importância deste polipeptídeo no controle do metabolismo mitocondrial, sendo o primeiro trabalho a mostrar que ligantes/receptores de hormônios peptídicos são verificados na membrana dessa organela celular (MCCUDDEN et al., 2002). Embora se saiba que a STC-1 atue como um ligante, o (s) receptor (es) e/ ou transdução de sinal deste hormônio permanecem elusivas (LI et al., 2018).

SCHEIN et al. (2015) demonstraram o papel da STC-1 na síntese de glicose via gliconeogênese renal em ratos e peixes. Tanto a incorporação de ^{14}C -glutamina em ^{14}C -glicose quanto a atividade e os níveis de RNAm da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) diminuíram, em resposta à ação, *in vitro*, da STC-1 na medula renal. Por outro lado, em peixes essa resposta foi diferente e a STC-1 aumentou a incorporação de ^{14}C glutamina em ^{14}C glicose, enquanto reduziu a gliconeogênese a partir de ^{14}C -lactato (SCHEIN et al., 2015).

SERLACHIUS & ANDERSSON (2004) estudando a adipogênese *in vitro*, com linhagem celular 3T3-L1, observaram aumento na expressão proteica da STC-1 em adipócitos em estágio final de maturação. A STC-1 contribuiu para a sobrevivência de células adiposas maduras que perderam sua capacidade de renovação, sugerindo seu envolvimento com a homeostase do TAB (SERLACHIUS & ANDERSSON, 2004). Com utilização da técnica de imuno-histoquímica em TAB de humanos, foi observada a presença de STC-1 no citoplasma de adipócitos maduros. Além disso, em

hibernomas (tumores benignos histologicamente semelhantes à gordura marrom) de humanos, a expressão da STC-1 também foi descrita (SERLACHIUS et al., 2004). Em ratos *Wistar* machos alimentados, a STC-1 foi capaz de aumentar a lipogênese no TAB retroperitoneal (COZER et al., 2016). No entanto, a STC-1 diminui a incorporação do ^{14}C da glicose em lipídios totais no TAM (COZER et al., 2017). Em ratos machos submetidos ao jejum de 24h a STC-1 aumentou a capacidade gliceroneogênica do TAM (SARAPIO, 2014).

O cDNA da STC-2 codifica uma proteína de 302 aminoácidos (55 aminoácidos mais longa do que a STC-1 humana) e possui 34% de identidade com STC-1 humana. A STC-2 é um parálogo da STC-1 e foi descoberta através de pesquisas de bioinformática em 1998 (CHANG & REDDEL, 1998). A STC-2 é expressa em diversos tecidos de camundogos, ratos e humanos (YEUNG et al., 2012). Recentemente foi demonstrado que a STC-2 é expressa no TAM de camundongos (HJORTEBJERG et al., 2018). A STC-2 é expressa em muitos tipos de tecidos cancerígenos, sendo indicador de um prognóstico ruim para o câncer (ZEIGER et al., 2011; HOU et al., 2015; CHEN et al., 2016). Estudo recente mostrou que em camundongos (C57BL/6), suscetíveis à obesidade, ao diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e à aterosclerose a STC-2, quando injetada intracerebroventricular, foi capaz de diminuir a ingestão alimentar. Quando administrada intraperitonealmente aumentou os níveis de RNAm do neuropeptídeo pró-opiomelanocortina (POMC), regulando assim, o apetite e o peso corporal desses animais (JIAO et al., 2017). No TAB epididimal, a STC-2 aumentou a atividade gliceroneogênica de ratos alimentados, mas não de ratos jejuados por 24h. (SARAPIO, 2014).

O pâncreas tem um papel bem estabelecido no metabolismo intermediário. Em camundongos adultos, a STC-1 se co-localiza com a insulina, sendo expressa pelas

células beta das ilhotas pancreáticas (ZAIDI et al., 2012). A STC-2 é expressa junto com o glucagon nas células alfa das ilhotas pancreáticas de humanos (MOORE et al., 1999). Com base nessa localização, pode-se supor que as stanniocalcinas têm um papel regulador no metabolismo da glicose. Em humanos, estudo recente mostrou uma correlação significativa entre STC-1, glicemia e hemoglobina glicada em pacientes com DM2, enquanto que os pacientes que apresentaram os maiores valores de hemoglobina glicada tinham menor expressão de STC-2 (LOPEZ et al., 2017).

Além das isoformas descritas (STC-1 e STC-2), foram encontradas variantes de alto peso molecular denominadas de *big* STCs (PACIGA et al. 2003; 2005). Estas moléculas foram localizadas em ovário bovino, bem como no TAB retroperitoneal de ratos (PACIGA et al., 2003; 2005).

Em situações fisiológicas normais, tanto a STC-1 quanto a STC-2 não são encontradas na corrente sanguínea de mamíferos. O hormônio STC-1 é detectável na circulação em humanos apenas durante a gravidez e a lactação (DEOL et al., 2000; JUHANSON et al., 2016). Esse fato, somado à comprovação da existência do cDNA de STC em diferentes tecidos de mamíferos, sugere que esses hormônios ajam como fatores parácrinos ou autócrinos (DE NIU et al., 2000).

Fundamentada nos achados da literatura expostos acima, nossa hipótese baseia-se que o padrão de resposta metabólica aos hormônios hSTC-1 e 2 nos tecidos adiposos branco e marrom pode ser alterado pelo estado alimentar (alimentado ou jejuado por 48h) dos ratos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar o papel metabólico dos hormônios hSTC-1 e hSTC-2 sobre o metabolismo intermediário do TAM e TAB de ratos adultos machos, alimentados e em jejum de 48h.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Determinar, *in vitro*, os efeitos da hSTC-1 e da hSTC-2 sobre o metabolismo lipídico e glicídico no TAB epididimal de *Rattus norvegicus* machos, linhagem *Wistar* alimentados e em jejum de 48h. Para este fim, foram avaliados:

- a) Captação de [2- ^{14}C] desoxi-glicose;
- b) Incorporação de U^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$;
- c) Incorporação de ^{14}C -glicerol e de U^{14}C -glicose em ^{14}C -glicerídeo-glicerol e ^{14}C -ácido graxos;
- d) Dosagens séricas de glicose e dos hormônios leptina e insulina.

2.2.2 Determinar, *in vitro*, os efeitos da hSTC-1 e da hSTC-2 sobre o metabolismo lipídico e glicídico no TAM interescapular de *Rattus norvegicus* machos, linhagem *Wistar* alimentados e em jejum de 48h. Para este fim, foram avaliados:

- a) Captação de [2- ^{14}C] desoxi-glicose;
- b) Atividade da enzima hexocinase;
- c) Incorporação de U^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$;

- d) Incorporação de ^{14}C -glicerol e de U- ^{14}C -glicose em ^{14}C -glicerídeo-glicerol e ^{14}C -ácido graxos;
- e) Níveis de lactato tecidual;
- f) Níveis de glicogênio tecidual;
- g) Expressão gênica da *Stc1* e da *Stc2*;
- h) Dosagens séricas de glicose e lactato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com o protocolo de número 27534 (comprovante disponível no Anexo I). O projeto foi desenvolvido no laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) em conjunto com o laboratório de Fisiologia Celular (Fiscel) e do laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (Labimet) do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Todos os procedimentos desse estudo foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal- CONCEA.

3.2. Animais e desenho experimental

Foram utilizados 120 *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*, machos, adultos, de 300±50g obtidos do CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais em Laboratório) do campus do vale – UFRGS, os quais foram alojados no Biotério setorial do Departamento de Farmacologia, do ICBS da UFRGS. Os animais foram alojados em caixas/moradias de polipropileno (410 mm x 340 mm x 160 mm) com grades altas que asseguram altura mínima de 17,8 cm. A área interna de cada gaiola é de 1110 cm², assegurando uma área de 187,05 cm² por animal. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de 21°C e ciclo de 12h claro/12h escuro e a umidade mantida entre 40-60% (2 animais por caixa). Foram realizadas três trocas de caixas por semana, com aproximadamente 05 cm de cama de maravalha de *Pinnus sp* previamente

autoclavada. A higienização das caixas, grades, bebedouros e bicos foram realizados com detergente neutro e imersas por 2h em solução de hipoclorito a 10%.

Os animais passaram por um período de 1 semana de aclimação ao biotério (Figura 2) e após a aclimatados foram randomicamente divididos em dois grupos: animais alimentados e animais submetidos ao jejum de 48 horas. Os animais alimentados receberam, *ad libitum*, água e dieta padrão comercial para roedores (20% proteína, 55% carboidrato e 4,5% de lipídio; Rodent Chow, Nutrilab[®], São Paulo, Brazil). Os animais jejuados receberam água *ad libitum* e foram alojados individualmente com maior quantidade de maravalha para garantir melhor conforto térmico. Em todos os experimentos, os animais jejuados iniciaram a restrição dietética às 9 horas da manhã. O monitoramento foi realizado diariamente, possibilitando a identificação de alterações relacionadas à saúde e ao conforto dos animais.

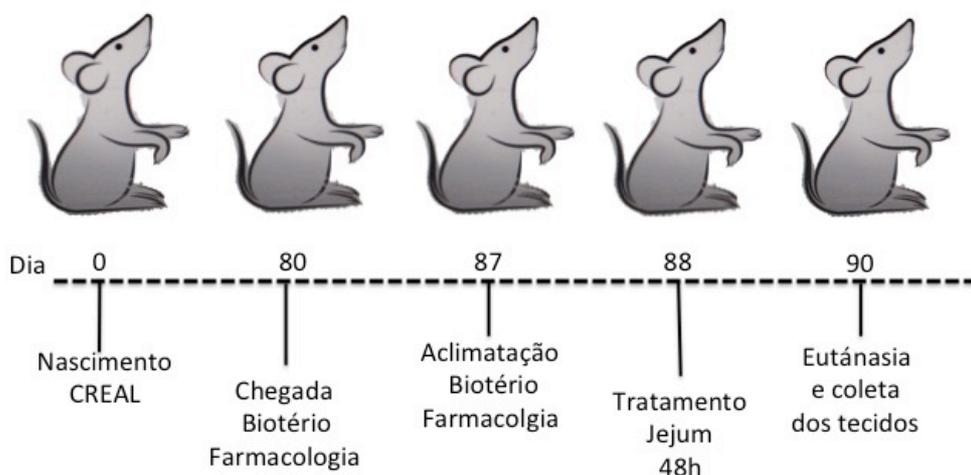


Figura 2: Desenho experimental do estudo. Os animais chegaram ao biotério setorial da Farmacologia aos 80 dias e foram aclimatados por uma semana. Aos 88 dias foi iniciado o jejum de 48h e os animais foram eutanasiados aos 90 dias.

3.3. Eutanásia, coleta de sangue e coleta de tecidos

Os animais foram mortos por decapitação em guilhotina específica para pequenos animais, sem anestesia, para obtenção do sangue total e dos TAB epididimal e TAM. O procedimento de eutanásia foi realizado pelos pesquisadores responsáveis, os quais possuem experiência e treinamento para a realização desta atividade. A eutanásia baseia-se no fato de ser um método eficaz que produz um menor estresse aos animais. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e a realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por ocasião da decapitação. Essa forma de eutanásia é utilizada por pesquisadores da área

de metabolismo de diversos países e aceita pelas revistas internacionais indexadas e de alto impacto (BROWN et al., 2005; SAHA et al., 2005).

No dia da eutanásia, os animais foram transferidos para uma sala no laboratório de metabolismo e endocrinologia comparada - LaMEC, separada daquela onde ocorreu a decapitação e os experimentos, em ambiente tranquilo, com temperatura controlada e água *ad libitum*. Após a eutanásia de cada animal, a guilhotina foi higienizada e vaselina em pasta foi passada na navalha para conservação do fio, bem como, ocorreu higienização da bancada.

O sangue troncular foi coletado em tubos com ativador de coagulação e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos para separação do soro. As amostras de soro foram congeladas até sua utilização e armazenadas em freezer -80°C. O TAM e o TAB epididimal foram excisados.

3.4. Procedimentos Experimentais *in vitro*

Após a excisão, os tecidos foram pesados inteiros e fatiados sobre placas de Petri umedecidas com Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB) pH 7,4: NaCl 118mM; KCl 4,8mM; CaCl₂ 1,3mM; KH₂PO₄ 1,2mM; MgSO₄ 1,2mM; NaHCO₃ 24,8mM. Após, as amostras de tecido foram pesadas e pré-incubadas por 15 minutos. A pré-incubação foi realizada com os tecidos em tubos de polietileno contendo 1mL de KRB, pH 7,4, aerados com gás carbogênio (O₂:CO₂, 95:5%, v/v) por 30 segundos a 37°C, sob agitação constante, em banho metabólico tipo *Dubnoff*.

3.5. Hormônios

Os hormônios hSTC-1 e hSTC-2 foram adquiridos a partir de *Recombinant Human* hSTC-1 e hSTC-2, HEK 293 (RayBiotech Inc. EUA). Utilizamos 3 concentrações de hSTC-1 e de hSTC-2 para o TAB (Figura 3): 0,386pM, 3,86pM e 38,6pM, diluídas em KRB. Para o TAM foi utilizada apenas 1 concentração de hSTC-1 e de hSTC-2 de 3,86pM (Figura 3), igualmente diluídas em KRB, em função da pouca disponibilidade do tecido. As concentrações que foram utilizadas neste estudo são consideradas fisiológicas para roedores (De NIU et al., 2000; SAZONOVA et al., 2008). Além disso, estudos prévios do nosso laboratório utilizaram as mesmas concentrações de hSTC-1 e de hSTC-2 para demonstrar a ação destes hormônios sobre a gliconeogênese renal e o fluxo de glicose no TAB retroperitoneal e epididimal e no TAM (SCHEIN et al., 2015; COZER et al., 2016 e 2017; SARAPIO, 2014).

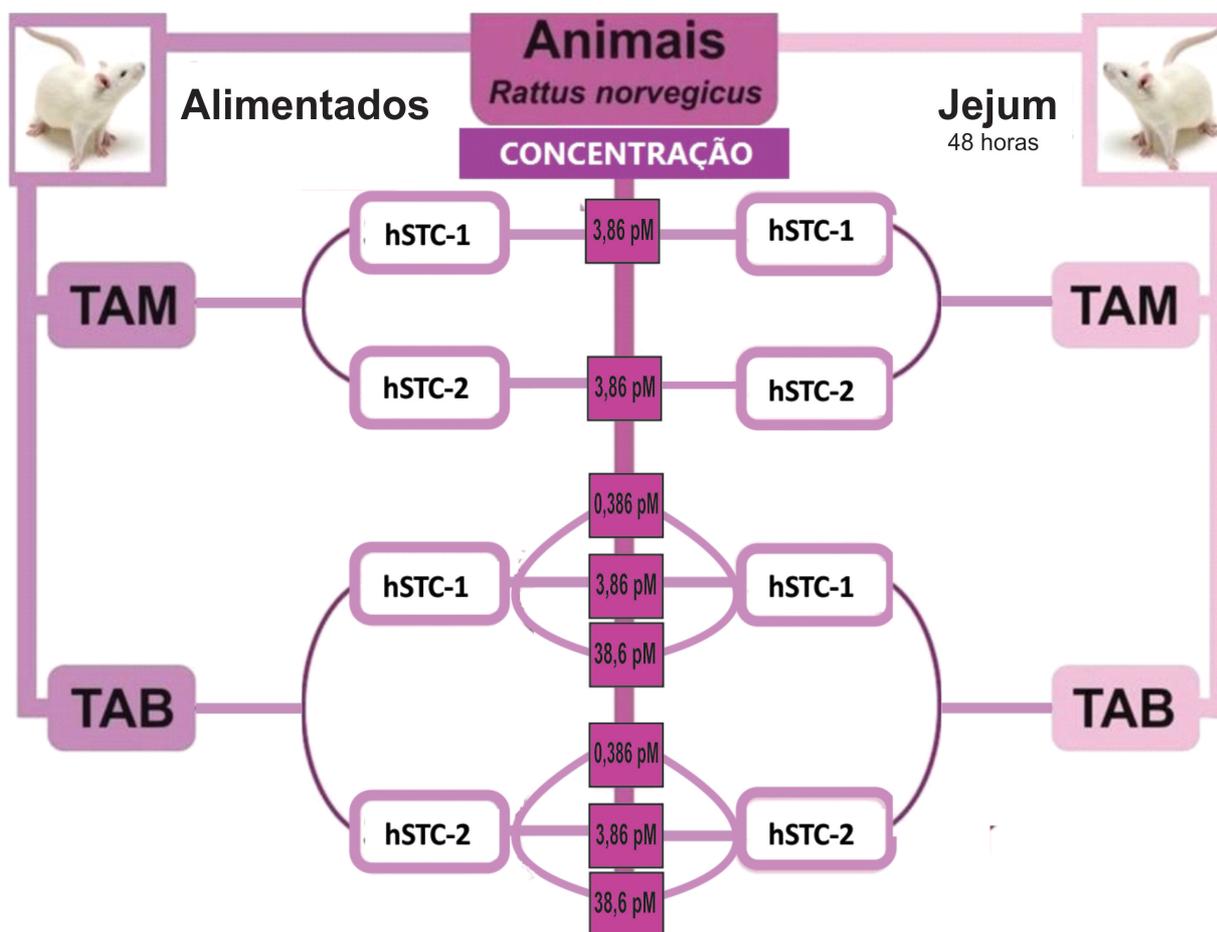


Figura 3: Concentrações dos hormônios hSTC-1 e hSTC-2

3.6. Captação de 2-¹⁴C-Desoxiglicose (2-DG)

A captação de glicose foi determinada de acordo com KAISER DE SOUZA et al., (2013). Após o período de pré-incubação, fatias do TAB e do TAM (100 ± 10 mg) foram removidas do meio de pré-incubação, secas e transferidas para novos tubos contendo 1 mL de KRB pH 7,4 com albumina de soro bovino a 1% (BSA) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) a 1%, equilibrada com O₂: CO₂ (95:5%, v/v) sem hSTC-1 ou hSTC-2 (controles) ou na presença das diferentes concentrações dos hormônios descritos na seção 3.5 (Figura 3), mais 0,2 μ Ci de 2-DG (Amersham, 286 mCi /mmol) e incubados por 120 minutos (TAM) ou 60 minutos (TAB). Após incubação, as fatias de

tecido foram removidas do meio, lavadas com KRB pH 7,4, secas em papel filtro, imediatamente transferidas para tubos de tampa rosca contendo 1 mL de água destilada e alternadamente congeladas e fervidas por três vezes. Amostras (100 µL) desta solução e do meio de incubação foram utilizadas para contagem da radioatividade em 2 mL de líquido de cintilação: tolueno, triton X-100 (2: 1, v/v), PPO 0,4% e POPOP 0,01%. Os resultados foram expressos como relação tecido/meio (T/M), relação da radioatividade do meio interno (glicose captada pelos tecidos) sobre o meio externo (meio de incubação). $T/M = \text{dpm/mL meio interno} / \text{dpm/mL meio externo}$.

3.7. Incorporação de [U-¹⁴C] -glicose em ¹⁴CO₂

Após o período de pré-incubação, fatias do TAB e do TAM (100 ± 10 mg) foram incubadas sob as condições descritas na seção 3.5, mas na presença de 0,2 µCi de [U-¹⁴C] -glicose (289 mCi /mmol; PerkinElmer) e 5 mM de glicose. Nas tampas de borracha dos frascos de incubação foram fixados vidros em formato de “J” com um poço onde uma tira de papel *Whatman*TM 3MM foi introduzida e embebida em 1M Hyamine® (0,2 mL) para reter o ¹⁴CO₂ produzido pela oxidação dos substratos. A incubação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% através da tampa de borracha. Os frascos foram vedados com parafilme e permaneceram em capela por 24 h. Posteriormente, o papel 3MM foi transferido para frascos de incubação contendo 2 mL de líquido de cintilação. Os valores de produção de ¹⁴CO₂ foram expressos em mmol de ¹⁴C de glicose incorporada em ¹⁴CO₂ . mg⁻¹. h⁻¹ de incubação (BUENO et al., 1994).

3.8. Incorporação do ^{14}C da $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose ou $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicerol em ^{14}C -glicerídeo-glicerol e ^{14}C -ácidos graxos

Após o período de pré-incubação, fatias TAB ou TAM (100 ± 10 mg) foram incubadas nas condições descritas na seção 3.5 (Figura 3), mas na presença de $0,2 \mu\text{Ci}$ de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose ($289 \text{ mCi} / \text{mmol}$; PerkinElmer) mais 2 mM de glicose ou $0,2 \mu\text{Ci}$ de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicerol ($142 \text{ mCi} / \text{mmol}$; PerkinElmer) mais 1 mM de glicerol. Após o período de incubação, os lipídios foram extraídos com clorofórmio: metanol (2:1, v/v), como descrito por Folch et al. (1957). Uma amostra do extrato lipídico total foi saponificada com KOH etanólico por 1 hora a 70°C . Em seguida, as amostras foram centrifugadas duas vezes com éter de petróleo (5 minutos, 420 xg). A reação de saponificação com ácido graxo foi completada com verde de bromocresol (0,04%). A fase inferior foi acidificada com H_2SO_4 6N e centrifugada (5 minutos 420 xg) com 5 ml de clorofórmio. Em seguida, uma amostra da fase aquosa contendo ^{14}C -glicerídeo-glicerol foi transferida para frascos contendo 5 mL de líquido de cintilação (BOTION et al., 1995). Os resultados foram expressos em mmol de ^{14}C -glicose e de ^{14}C -glicerol incorporados em ^{14}C -glicerídeo-glicerol ou ^{14}C -ácido graxo. $\text{mg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de incubação.

3.9. Expressão gênica das stanniocalcinas 1 e 2

O TAM foi pré-incubado e incubado com KRB pH 7,4 sem os hormônios. Após a incubação, o RNA total do TAM foi extraído com o reagente Trizol[®] (conforme protocolo do fabricante *Life Technologies*). As amostras de RNA foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro para quantificação de ácidos nucleicos, NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Apureza do RNA foi avaliada utilizando a razão da absorbância A260/A280 entre 1,7 e 2,0 nm. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. A síntese de cDNA foi realizada, utilizando o kit

SuperScript[®] First-Strand Synthesis System for qPCR (protocolo do fabricante *Invitrogen*). *Primers* específicos foram desenhados para os genes em estudo: STC-1 e STC-2, usando o programa IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc., USA). As reações de PCR em temporeal (qPCR), foram realizadas em triplicata. Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa StepOne Software versão 2.0. Reações controle foram realizadas para verificar se nenhuma amplificação de material ocorreu nos poços que não continham o cDNA. Os valores de Ct (*Cycle Threshold*) das triplicatas foram utilizados para o cálculo da expressão dos genes estudados, com normalização pelo gene controle endógeno beta actina, usando o método 2DCt (comparação dos valores de Ct do gene alvo e gene de referência) (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008; LAW et al., 2012; KALINOVICH et al., 2017).

3.10. Determinação do glicogênio tecidual

O TAM foi incubado conforme seção 3.5 e a concentração do glicogênio tecidual foi determinada pelo método de VAN HANDEL et al. (1965), com algumas modificações. Após o período de incubação, o tecido foi colocado em tubos de vidro em presença de 0,5 mL de hidróxido de potássio (KOH) a 1M e incubado a 70°C em banho metabólico por 60 minutos. Após a incubação, foi adicionado 0,01mL de sulfato de sódio (Na₂SO₄) a 35%. Os tubos foram centrifugados a 420 x g por 15 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em água destilada e etanol a 95% e centrifugado novamente. Para hidrólise do glicogênio em glicose livre, foram adicionados 0,1 mL de água destilada e 0,1 mL de HCL 4M. As amostras foram novamente mantidas em banho metabólico por 60 minutos e, após, neutralizadas com 0,1 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 2M. Após a hidrólise ácida e neutralização, os equivalentes de glicose foram medidos com kit comercial colorimétrico para

dosagem de glicose da Labtest®. Resultados foram expressos como mg de glicogênio por grama de tecido.

3.11. Análises Bioquímicas

Os tecidos foram pré- incubados e incubados conforme seção 3.5, transferidos para microtubos de poliestireno e guardados a -80°C. Para a dosagem de lactato tecidual, os tecidos foram guardados em tubos com fluoreto de sódio (NaF) 0,1M e dosado com kit enzimático comercial (Labtest®) e expressos como nmol/mL. Para a atividade da enzima hexocinase (HK [EC2.7.1.1]) foi utilizado kit *Hexokinase Assay* MAK091 (Sigma Aldrich®). Os resultados foram expressos como nmol. min⁻¹. ml⁻¹.

A glicose e o lactato séricos foram quantificados com kits comerciais (Labtest®), conforme protocolo do fabricante e expressos como mg/dL. Os níveis de leptina e de insulina no soro foram determinados com kits comerciais (ELISA) Rat/Mouse Insulin Elisa Kit EZRMI-13K e Rat Leptin EZRL-83K (Millipore Corporation®). Todas as amostras foram realizadas em duplicata. As concentrações de leptina e insulina foram expressas como ng/mL de soro.

3.12. Cuidados com relação ao descarte da amostra e de materiais tóxicos

Os ensaios foram realizados com o uso dos equipamentos de proteção individual: avental, luva cirúrgica, e óculos e máscara quando necessário. O descarte de amostras, bem como de materiais tóxicos e contaminantes foram realizadas de acordo com as normas da UFRGS. As carcaças dos animais mortos foram colocadas em sacos plásticos brancos, identificados e encaminhados ao biotério setorial no ICBS - UFRGS, onde foram recolhidos por empresa terceirizada, responsável pelo serviço

de coleta de materiais biológicos de descarte. Materiais tóxicos foram usados em capela de exaustão e os descartes encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação. Os resíduos dos traçadores marcados com ^{14}C foram descartados segundo as normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear, norma NN 8.01 - resolução 167/14 (CNEN - 2014).

3.13. Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média ou mediana (intervalo interquartil), quando apropriado. Os dados foram verificados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Levene). Análise de variância de duas vias seguida de teste de post-hoc de Tukey /Bonferroni para comparação de médias. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparações de variáveis com distribuição assimétrica com o teste post-hoc de Dunn. O teste t de Student não pareado foi usado para comparar diferenças nos pesos dos tecidos e nas dosagens séricas dos grupos de animais alimentados e em jejum. Todos os testes e comparações com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Prism Plot versão 6.0 (GraphPad Prism Software) para Windows e o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 18.0.

4. RESULTADOS

Os resultados estão organizados na forma de artigos completos (Anexo II) de acordo com os experimentos descritos na seção 3.

4.1. Artigo 1

Título: Stanniocalcin-1 and -2 effects on glucose and lipid metabolism in white adipose tissue from fed and fasted rats

Revista: Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

Artigo Aceito: Maio 2019



Elaine Sarapio <elainesarapio@gmail.com>

cjpp-2019-0023.R2 - Notice of Acceptance / Décision concernant le manuscrit

1 mensagem

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology

7 de maio de 2019

<onbehalf@manuscriptcentral.com>

12:39

Responder a: cjpp@cdnsciencepub.com

Para: elainesarapio@gmail.com, samirks@hotmail.com, pyargenta@gmail.com, mtrapp@ufrgs.br, roselis@ufrgs.br

Dear Dr. Sarapio:

We are pleased to inform you that your manuscript is now acceptable for publication in Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.

Your manuscript will be returned to your Author Center for you to complete your production files task. You will receive an email entitled "Please Submit Production Files" which will contain formatting details for production quality files and the various permissions that your manuscript may need.

The Production Files step must be completed even if you have submitted an unmarked version of your manuscript with your revision.

A NOTE ABOUT SPECIAL ISSUES: Papers selected for inclusion in a Special Issue will be processed in a queue on the basis of the slated publication month designated for the Special Issue.

Sincerely,
Dr. Ghassan Bkaily
Editor in Chief for this Manuscript ID

On behalf of
Dr. Ghassan Bkaily and Dr. Pedro D'Orléans-Juste
Editors in Chief
Canadian Journal of Physiology & Pharmacology

4.2. Artigo 2

Título: Effects of Stanniocalcin hormones on rat brown adipose tissue metabolism under fed and fasted conditions

Revista: Molecular and Cellular Endocrinology

Data de Publicação: Fevereiro 2019

5. DISCUSSÃO

Transcorridos 180 anos da identificação da stanniocalcina, o conhecimento da participação deste intrigante hormônio na homeostase metabólica em mamíferos ainda apresenta muitas lacunas, uma vez que pouco se sabe a respeito de seus efeitos sobre o metabolismo intermediário dessa classe de animais. Outro ponto, ainda pouco conhecido, é a ligação das STCs a receptores e a transdução do sinal nas células-alvo. Com o objetivo de esclarecer o papel das STCs sobre o metabolismo das células adiposas, o presente estudo demonstrou pela primeira vez o efeito, *in vitro*, das stanniocalcinas humanas 1 e 2 sobre os fluxos da glicose e do glicerol em tecidos adiposos branco epididimal e marrom de ratos alimentados e em jejum (48h). Além disso, demonstramos que o estado alimentar do animal regula a expressão desses hormônios no tecido adiposo marrom.

5.1 Tecido adiposo branco epididimal

Nos últimos 50 anos, a percepção fisiológica e bioquímica sobre as funções do tecido adiposo branco evoluiu muito. Além das funções de armazenamento de reserva energética e de manutenção de temperatura, os adipócitos brancos funcionam como células endócrinas sofisticadas, cuja capacidade de liberação de hormônios pode mudar dependendo da concentração de lipídios armazenada (DE PAULA & ROSEN 2018), do estado metabólico dos indivíduos (alimentados ou jejuados) e de estímulos endócrinos ou nervosos.

Roedores possuem depósitos de TAB visceral na região perigonadal, que em machos é conhecida como gordura epididimal. O TAB epididimal de ratos não é o depósito adiposo mais análogo ao intra-abdominal encontrado em humanos, porém, é o maior depósito de TAG e o mais acessível (CHUSYD et al., 2016). SERLACHIUS &

ANDERSSON (2004) utilizando técnica de imuno-histoquímica, identificaram em TAB de humanos a presença da STC-1. A STC-2 é expressa em todos os depósitos adiposos de camundongos e apresenta uma alta expressão gênica no TAB epididimal (HJORTEBJERG et al., 2018). Esses dados sustentam a visão de que as stanniocalcinas emergem como um novo modulador do metabolismo intermediário em adipócitos de mamíferos.

No presente estudo, os ratos alimentados apresentaram valores sorológicos elevados de glicose, insulina e leptina, quando comparados aos animais em jejum de 48h. No grupo de ratos alimentados, as hSTCs 1 e 2 aumentaram a captação de glicose no TAB. Além disso, a hSTC-1 também aumentou a captação de glicose no TAM de ratos alimentados. SCHEIN et al. (2015) demonstraram que a hSTC-1 diminuiu a atividade gliconeogênica renal em ratos alimentados, sugerindo a participação deste hormônio na homeostase da glicose em mamíferos. Desta forma, uma redução na capacidade de síntese de glicose pelo rim e o aumento da captação de glicose pelos TAB e TAM seriam fatores importantes para a manutenção dos níveis de glicose, especialmente em pacientes com diabetes tipo-2. Os achados de JIAO et al. (2017) reforçam esta hipótese, pois estes autores constataram, em camundongos ob/ob (sem leptina), que a administração de hSTC-2 durante 10 dias consecutivos diminuiu significativamente os níveis de glicose circulante, aumentando a sensibilidade dos tecidos à insulina. Seriam as STCs (1 e 2) um novo hormônio controlador da homeostase da glicose no período pós-prandial, estimulando a captação de glicose no tecido adiposo branco?

ZEIGER et al. (2011) sugerem que as STCs teriam um importante papel na resposta celular ao estresse e, 48h de jejum é uma situação estressante para os ratos. Em TAB de ratos em jejum de 48h, as hSTC-1 e 2 estimularam a captação de glicose.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que no jejum de 48h ocorre redução na translocação do GLUT-4 do compartimento intracelular para a superfície da membrana plasmática de adipócitos brancos (FRASSON et al., 2012; PROENÇA et al., 2014). Desta forma, podemos sugerir que o efeito da hSTC-1 e 2 sobre a captação de glicose no TAB de ratos em jejum seria via regulação da expressão gênica e/ou *turnover* do GLUT-1 (BARRON et al., 2016; YAN, 2017). Em adipócitos 3T3-L1, o *turnover*, os níveis de RNAm e a expressão da proteína GLUT-1 aumentaram em adipócitos que sofreram, no meio de cultura, privação de glicose por 72 h (TORDJMAN et al., 1990). O GLUT-1 nos adipócitos 3T3-L1 tem um *turnover* de aproximadamente 14 h, mas nos adipócitos privados de glicose este valor foi superior a 50 h (MCMAHON & FROST, 1995). Porém, este efeito foi revertido pela adição de glicose ao meio de incubação (MCMAHON & FROST, 1995). Foi constatado que em outra situação estressante como no câncer, as expressões da STC-2 e do GLUT-1 nas células cancerígenas estão significativamente elevadas, sugerindo um aumento na captação basal de glicose essencial para o crescimento tumoral (efeito Warburg) (BARRON et al., 2016; THORENS & MUECKLER, 2010; YAN, 2017; JIAO et al. 2017).

No TAB, o jejum (48h) diminuiu a produção de ^{14}C - glicerídeo-glicerol e a síntese *de novo* de AG, contudo, a hSTC-1, na concentração utilizada neste trabalho, não afetou estas vias metabólicas. Em contraste, no estado alimentado, a hSTC-1 aumentou a incorporação do ^{14}C da glicose em glicerídeo-glicerol no TAB. COZER et al. (2016) também demonstraram que a hSTC-1 aumenta a incorporação do ^{14}C da glicose em lipídios totais no TAB retroperitoneal. Desta forma, no estado alimentado, a hSTC-1 mantém um suprimento adequado de glicerol-3-P necessário para a esterificação de AG e armazenamento de TAG no TAB epididimal. Entretanto, a hSTC-1 diminuiu a capacidade de síntese *de novo* de AG a partir de ^{14}C -glicose no TAB de ratos

alimentados. Essa diminuição levaria ao aumento da captação de AG a partir das lipoproteínas circulantes, regulando, assim, os níveis de AG no período pós-prandial. Os AG podem ser obtidos pela captação de fontes externas como os quilomicrons e os VLDLs ou pela síntese *de novo* a partir de substratos não lipídicos (PROENÇA et al., 2014). O armazenamento de AG-TAG no TAB é considerado um mecanismo de proteção contra a lipotoxicidade (CAO et al., 2008).

Embora a atividade da glicerocinase (GK) no TAB seja relativamente baixa em comparação com outros tecidos, como o TAM e o fígado (KAWASHITA et al. 2002; MARTINS-SANTOS et al. 2007), uma redução acentuada da atividade da GK no TAB foi observado em ratos em jejum (48h) e em diabéticos (FRASSON et al. 2012). Nossos dados estão de acordo com os relatos da literatura que mostram uma redução na capacidade de fosforilação direta do glicerol no TAB de controles jejuados por 48h (FRASSON et al. 2012). Contudo, a hSTC-1 não afetou diretamente a fosforilação do glicerol no TAB de ratos alimentados ou em jejum de 48h.

Nossos resultados demonstram que em ratos alimentados a hSTC-2 reduziu a geração de ^{14}C - glicerídeo-glicerol e a síntese *de novo* de AG a partir de ^{14}C -glicose, mas aumentou a captação de glicose no TAB. A hSTC-2 também diminuiu a fosforilação direta de glicerol no TAB de ratos alimentados, mas não afetou a síntese *de novo* de AG a partir de ^{14}C -glicerol (Figura 4). Assim, a hSTC-2 estaria bloqueando o efeito lipogênico característico do período pós-prandial, quando há substratos em abundância e as reservas energéticas devem ser repostas no TAB. Pode-se considerar que a hSTC-2 induz o TAB ao desperdício, pois reduz a utilização dos substratos energéticos nos processos endergônicos de síntese como a lipogênese. Estes achados são consistentes com dados de JIAO et al. (2017) que demonstraram que a administração intraperitoneal de STC-2 por 5 dias em camundongos C57BL/6 reduzia o peso e a

porcentagem do TAB epididimal e inguinal. Estes autores também demonstraram que a administração intraperitoneal de STC-2 por 10 dias em camundongos ob/ob diminuía marcadamente os níveis de RNAm dos genes adipogênicos PPAR γ , C/EBP α e C/EBP β (JIAO et al., 2017). O mecanismo de ação das STCs nas células alvo ainda não foi esclarecido, mas ZEIGER et al. (2011) sugerem que a STC-2 interage com o sensor de cálcio do retículo endoplasmático - *stromal interaction molecule 1* (STIM1), controlando a concentração intracelular de cálcio via - *store-operated Ca²⁺ entry* (SOCE). Desta maneira, a STC-2 diminuiria a concentração intracelular de cálcio. Recentemente, foi descoberto que a integridade das - *mitochondria-associated membranes* (MAMs) é um fator importante na transdução do sinal da insulina no fígado e no músculo esquelético e alterações nas MAMs estão associadas com resistência à insulina nestes tecidos, impactando a homeostase da glicose (TUBBS et al., 2014). No presente estudo, a concentração plasmática de insulina nos ratos alimentados está alta (1,15 \pm 0,25 ng/mL). Desta forma, no período pós-prandial a redução da concentração de cálcio intracelular induzida pela hSTC-2 levaria a alterações na transdução do sinal insulínico nas células adiposas, reduzindo a capacidade de síntese de TAG. O TAB exerce um papel importante na regulação do balanço energético em mamíferos e a incapacidade de síntese de TAG num período de abundância de substratos energéticos, como no estado alimentado, levaria à diminuição das reservas energéticas do organismo, da produção hormonal e de outras funções do TAB. (PROENÇA et al., 2014). Este gasto de energia é encontrado em camundongos que superexpressam STC-2, estes animais apresentaram hiperfagia, aumento do consumo de oxigênio em combinação com retardo de crescimento nos períodos pré- e pós-natal (GAGLIARDI et al., 2005).

Os resultados deste estudo mostram que as STCs controlam a captação de glicose no TAB epididimal tanto no estado alimentado como no jejum de 48h. Entretanto, as

STCs não aumentaram a formação de ^{14}C - glicerídeo-glicerol ou a síntese *de novo* de AG a partir de ^{14}C -glicose no TAB de ratos em jejum. Além disso, em ratos alimentados, a hSTC-2 aumentou significativamente a captação de glicose pelo TAB, mas diminuiu a formação de ^{14}C - glicerídeo-glicerol. Então, para onde a glicose captada esta sendo direcionada? Estudos *in vivo* e *in vitro* em adipócitos de ratos e de humanos mostram que, mesmo na presença de oxigênio, a via glicolítica produz concentrações razoáveis de lactato, o qual pode ser liberado por essas células (JANSSON et al., 1994; SABATER et al., 2014). No TAB a conversão da glicose em lactato no estado alimentado teria um papel na redução dos níveis de glicose circulante, um processo importante na preservação da sensibilidade dos tecidos à insulina (SABATER et al., 2014; KEUPER et al., 2014). O jejum altera o padrão do metabolismo da glicose nos adipócitos, aumentando a produção e liberação de lactato, fornecendo substrato para gliconeogênese ou oxidação em outros tecidos (DIGILORAMO et al., 1992). Recentemente, PETERSEN et al. (2017) demonstraram que a expressão gênica dos transportadores de lactato MCT1 e MCT4, envolvidos na captação e no efluxo de lactato, respectivamente, é regulada durante a diferenciação dos adipócitos e após estímulo pelo frio.

As STCs não alteram a oxidação de ^{14}C -glicose no TAB epididimal de ratos alimentados ou em jejum. Entretanto, no TAB retroperitoneal de ratos alimentados a hSTC-1 aumentou em 85% a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose (COZER et al., 2016). A resposta distinta dos TAB epididimal e do TAB retroperitoneal à hSTC-1 deve-se, ao controle hormonal e ao papel metabólico diferentes destes dois tecidos: o epididimal estaria envolvido no controle local do metabolismo e o retroperitoneal seria o principal depósito adiposo responsável pela homeostase energética do organismo (DOS SANTOS et al., 2012; FERREIRA et al., 2017).

5.2 Tecido adiposo marrom

Em ratos e humanos o TAM participa da regulação da temperatura corporal e da homeostase metabólica (FELDMANN et al., 2009), pois este tecido está envolvido tanto com o *clearance* dos triglicerídeos plasmáticos quanto com a homeostase da glicose (BARTELT et al., 2011). Diversos fatores, como a composição da dieta administrada aos animais e os estímulos simpático e hormonal, entre outros, influenciam a capacidade termogênica do TAM (RUI, 2017). O aumento dos ácidos graxos livres no citoplasma, derivados de uma dieta rica em gorduras, estimula a expressão de UCP1 e a diferenciação dos adipócitos marrons (GIRALT & VILLARROYA, 2013).

Nosso estudo mostrou pela primeira vez que a expressão da *Stc-2* foi maior nos ratos alimentados e jejuados quando comparada aquela da *Stc-1* e, que a expressão da *Stc-2* é marcadamente maior nos ratos em jejum do que naqueles alimentados (Figura 5). Recentemente, HJORTEBJERG et al. (2018) confirmaram a presença da *Stc2* em TAM de camundongos.

No TAM a inervação simpática controla a concentração de GLUT-1 na membrana celular (DALLNER et al., 2006) e a insulina controla a expressão e a translocação do GLUT-4 (TERUEL et al., 1996). Estes dois estímulos são os principais reguladores da captação de glicose no TAM (CANNON & NEDERGAARD, 2004). No presente estudo, os ratos alimentados foram mantidos com uma dieta balanceada até o momento do experimento. No estado alimentado, os ratos apresentavam os valores de insulina e de leptina plasmáticas elevados quando comparados aqueles dos animais em jejum de 48h. Neste padrão hormonal característico do estado alimentado, a hSTC-1 aumentou significativamente a

captação de glicose no TAM de ratos. Sabidamente, o TAM tem uma participação marcante na remoção da glicose circulante no estado alimentado, pois neste órgão a capacidade de captação desta hexose por unidade de peso é bastante elevada, apesar deste órgão representar uma pequena fração do peso corporal dos roedores (FESTUCCIA et al., 2011). Estudo, *in vitro*, realizado em nosso laboratório em TAM de ratos neonatos (14 dias) machos demonstrou que a hSTC-1, na mesma concentração (3,86 pM) utilizada nesta tese, também aumentou a captação de glicose neste tecido (dados ainda não publicados). Desta forma, a hSTC-1, estimulando a captação de glicose no TAM de ratos alimentados, exerceria uma função de hormônio hipoglicemiante. Estaria a hSTC-1 potencializando o efeito da insulina sobre a captação de glicose no TAM ou este hormônio também regula a expressão e/ou translocação do GLUT-4 por meio de via independente da insulina como a da AMPK? Entretanto, o aumento da captação de glicose no TAM induzida pela hSTC-1 no estado alimentado não foi acompanhado pela ativação da oxidação da glicose, da síntese de glicerol-3-P, da lipogênese *de novo* a partir de ¹⁴C-glicose ou do aumento da concentração de glicogênio. Devemos salientar que cerca de 50% da glicose captada pelo TAM é metabolizada e liberada como lactato (CARPENTIER et al., 2018). COZER et al. (2017) mostraram um aumento da concentração de ATP no TAM de ratos alimentados incubados em presença de hSTC-1, na mesma concentração utilizada na presente tese, que reforça a hipótese da formação de lactato a partir da glicose captada. Recentemente, PETERSEN et al. (2017) sugerem que ocorra uma regulação positiva dos transportadores de lactato MCT1 e MCT4 no TAM para mediar o fluxo de lactato durante a resposta termogênica. Esclarecimentos sobre o efeito da hSTC-1 nas expressões dos GLUT-1 e GLUT-4 e na atividade e na expressão gênica da lactato desidrogenase (LDH) no TAM de ratos alimentados são

necessários para compreender o papel deste hormônio sobre o metabolismo da glicose neste órgão.

No presente trabalho, a hSTC-2 não aumenta a captação da glicose ou altera a atividade das vias envolvidas na síntese de glicerol-3-P ou lipogênese *de novo* a partir de ^{14}C -glicose ou ^{14}C -glicerol no TAM de ratos alimentados. Além disso, nem a hSTC-1 ou a hSTC-2 alteraram a atividade da HK no TAM. Todavia, a hSTC-2 diminuiu de forma significativa a concentração de glicogênio no TAM de ratos alimentados, mantendo sem alterações os níveis de lactato no tecido e a capacidade de oxidação da glicose neste órgão. O TAM armazena uma concentração expressiva de glicogênio, que serve como importante fonte de glicose durante a termogênese, esta glicose é convertida em lactato pela glicólise anaeróbia, produzindo ATP (FARKAS et al., 1999; FESTUCCIA et al., 2011; JAKUS et al., 2008). Este ATP gerado compensaria a redução da produção de energia devido ao aumento da produção de calor via UCP-1 durante a termogênese sem tremor (CANNON & NEDERGAARD, 2004). No fígado de ratos alimentados, a hSTC-2, em concentração similar à usada em nosso estudo, aumentou marcadamente a atividade da piruvato cinase (PK) (GONÇALVES, 2012). No período pós-prandial, quando há abundância de substrato energético e as reservas energéticas são aumentadas, a mobilização de glicogênio induzida pela hSTC-2 no TAM pode ser considerado um desperdício de energia.

Em fibroblastos de camundongos, a STC-2 reduz a concentração intracelular de cálcio regulando negativamente o SOCE (ZEIGER et. al., 2011). Os autores sugerem que a STC-2 interage com o sensor de cálcio do retículo endoplasmático STM1, diminuindo a concentração intracelular de cálcio (ZEIGER et. al., 2011). No presente estudo, os valores de insulina no soro dos ratos alimentados é de $1,15 \pm 0,25 \text{ ng/ml}$. Portanto, podemos sugerir que a hSTC-2, regulando negativamente o SOCE no TAM,

alteraria a transferência de cálcio entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria, interferindo na sinalização intracelular da insulina neste tecido e levando à redução dos níveis de glicogênio no período pós-prandial. A redução na concentração de glicogênio no TAM, por ação da hSTC-2, teria uma ação deletéria com diminuição na capacidade termogênica, esterificação de AG, entre outras funções deste tecido (FETUCCIA et al., 2011). Este gasto de energia é encontrado em camundongos que superexpressam STC-2, estes animais apresentaram hiperfagia, aumento do consumo de oxigênio em combinação com retardo de crescimento nos períodos pré- e pós-natal (GAGLIARDI et al., 2005). O excesso de hSTC-2 nestes animais leva à morte de cerca de 26-34% de ratos no período pós-natal (GAGLIARDI et al., 2005). O TAM é o principal tecido termogênico em mamíferos placentários recém-nascidos (como os ratos) e o mecanismo de produção de calor sem tremor é o principal mecanismo de termogênese nestes animais (ENERBÄCK, 2010). Os resultados deste trabalho demonstram que a hSTC-2 altera o metabolismo do glicogênio no TAM, sugerindo que a mortalidade no período pós-natal em ratos que superexpressam este hormônio possa ser devido à incapacidade do TAM em gerar calor por meio da mobilização de glicogênio. Estudos futuros em ratos recém-nascidos que super-expressão hSTC-2 serão importantes para esclarecer esta hipótese.

O jejum é uma situação estressante para ratos e humanos e a ativação do sistema simpático aumenta a captação de glicose no TAM, via GLUT-1, e diminui a atividade metabólica basal (CANNON & NEDERGAARD, 2004). Os dados deste trabalho mostraram que nos ratos submetidos ao jejum de 48h a captação de glicose foi maior comparada aquela dos ratos alimentados. Em ratos jejuados e submetidos ao frio, que também é uma situação estressante, ocorreu aumento da captação de glicose pelo TAM (SHIBATA et al., 1989). Assim, o aumento da captação de glicose após 48 h de

jejum demonstra um incremento na eficiência metabólica do TAM durante os períodos de escassez de suprimento de glicose plasmática. O jejum de 48h não alterou significativamente a concentração de glicogênio no TAM. O jejum induz à redução no peso do TAM e da atividade das vias de síntese de ^{14}C -glicerídeo-glicerol e lipogênese *de novo* a partir de ^{14}C -glicose, diminuindo o fluxo de glicose neste tecido. Desta forma, o aumento na captação de glicose forneceria energia durante o jejum sem necessitar mobilizar as reservas de glicogênio. Além disso, nos ratos em jejum a síntese *de novo* de AG a partir de ^{14}C -glicerol foi semelhante àquela do grupo alimentado. O jejum de 48h estimula a gliceroneogênese no TAM de ratos (FETUCCIA et al., 2003). Os AG podem ser obtidos por meio da captação de fontes externas (quilomicrons e VLDL). Contudo, durante o jejum estas fontes são escassas no plasma (VILLARROYA et al., 2013). Assim, a lipogênese *de novo* a partir de glicerol reciclado da hidrólise dos estoques de TAG ou da gliceroneogênese durante o jejum mantém o ciclo TAG/AG no TAM (HANSON & RESHEF, 2003). Portanto, após 48h de jejum, a manutenção da lipogênese a partir de ^{14}C -glicerol aumentaria a energia convertida em calor mediada pela UCP-1, pois a interação da UCP-1 com AG muda a conformação da proteína e o transporte de prótons ocorre (CARPENTIER et al., 2018).

As STCs têm papel importante na resposta celular ao estresse (ZHANG et al., 2000; ZEIGER et al., 2011). Após 48h de jejum, a expressão da *Stc1* permanece similar àquela do grupo alimentado. Entretanto, a expressão da *Stc2* aumenta duas vezes no grupo em restrição alimentar de 48h. Este aumento marcante na expressão da *Stc2* sugere uma participação deste hormônio no controle do metabolismo do TAM durante o jejum prolongado. O jejum aumenta a captação de glicose no TAM, mas nem a hSTC-1 ou a hSTC-2 alteram o transporte de glicose. Contudo, a hSTC-1

aumenta a oxidação de glicose no TAM de ratos em jejum sem mobilizar as reservas de glicogênio, incrementando a eficiência metabólica durante o jejum de 48h. Este padrão metabólico aumenta a produção de energia necessária para manter a atividade da via gliconeogênica durante o jejum (FETUCCIA et al., 2003). Em compensação, a hSTC-2 aumenta marcadamente a concentração de glicogênio no TAM de ratos em jejum. A mobilização de glicogênio pela enzima glicogênio fosforilase (GP) está sob o controle de dois mecanismos: o alostérico e a fosforilação (ROACH, 2002; DiNUZZO et al., 2013). A regulação pela fosforilação envolve a ativação da enzima fosforilase cinase (PhK), a qual fosforila a GP causando a transição da forma inativa fosforilase *b* (GP_b) para forma ativa fosforilase *a* (GP_a). O cálcio se liga à GP_b promovendo a conversão para sua forma ativa a GP_a (BRUSHIA & WALSH, 1999). A STC-2 regula negativamente a SOCE, diminuindo a concentração intracelular de cálcio. Assim, a conversão da GP_b para a GP_a não ocorre, diminuindo a mobilização de glicogênio durante o jejum de 48h. Outra hipótese seria que a hSTC-2 estaria transferindo os carbonos da glicose para a síntese de glicogênio ao invés da síntese de lipídios, pois os resultados mostraram que no TAM dos animais em jejum ocorre uma drástica redução das vias metabólicas envolvidas com a síntese de glicerol-3-P e lipogênese *de novo* a partir de ¹⁴C-glicose. A elucidação dos efeitos da hSTC-2 sobre a síntese de glicogênio no TAM de ratos alimentados e em jejum serão necessários para esclarecer estes pontos.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou pela primeira vez um efeito oposto entre a hSTC-1 e a hSTC-2 sobre a produção de glicerol-TAG a partir de ¹⁴C-glicose no TAB de ratos

alimentados: a hSTC-1 aumenta e a hSTC-2 reduz a formação de glicerol-TAG a partir da ^{14}C -glicose. Além disso, a hSTC-2 reduz a fosforilação direta do glicerol e a síntese *de novo* de AG a partir de ^{14}C -glicose no TAB de ratos alimentados. Contudo, as STCs aumentam a captação de glicose no TAB de ratos alimentados ou em jejum. Estes achados evidenciam o papel das STCs sobre a regulação do metabolismo da glicose e de lipídios no TAB de ratos alimentados ou em jejum de 48h (Figura 4).

O estado alimentar controla a expressão da *Stc2* no TAM, aumentando-a significativamente após 48h de jejum. As STCs não alteraram no TAM de ratos alimentados ou em jejum de 48h, a síntese de ^{14}C -glicerol-TAG e ^{14}C -AG a partir de ^{14}C -glicose ou ^{14}C -glicerol. Os alvos da ação das hSTC-1 e da hSTC-2 no TAM são a captação de glicose e sua oxidação e a concentração de glicogênio, controlando por meio destas vias o metabolismo da glicose neste órgão (Figura 5). A redução da concentração de glicogênio no TAM induzida pela hSTC-2 pode ocasionar efeitos deletérios importantes neste tecido, como a redução na capacidade termogênica, a esterificação de AG e outras funções dos adipócitos. O aumento da captação de glicose por ação da hSTC-1 no TAM de ratos alimentados é importante para a redução dos níveis plasmáticos de glicose no período pós-prandial.

White Adipocyte

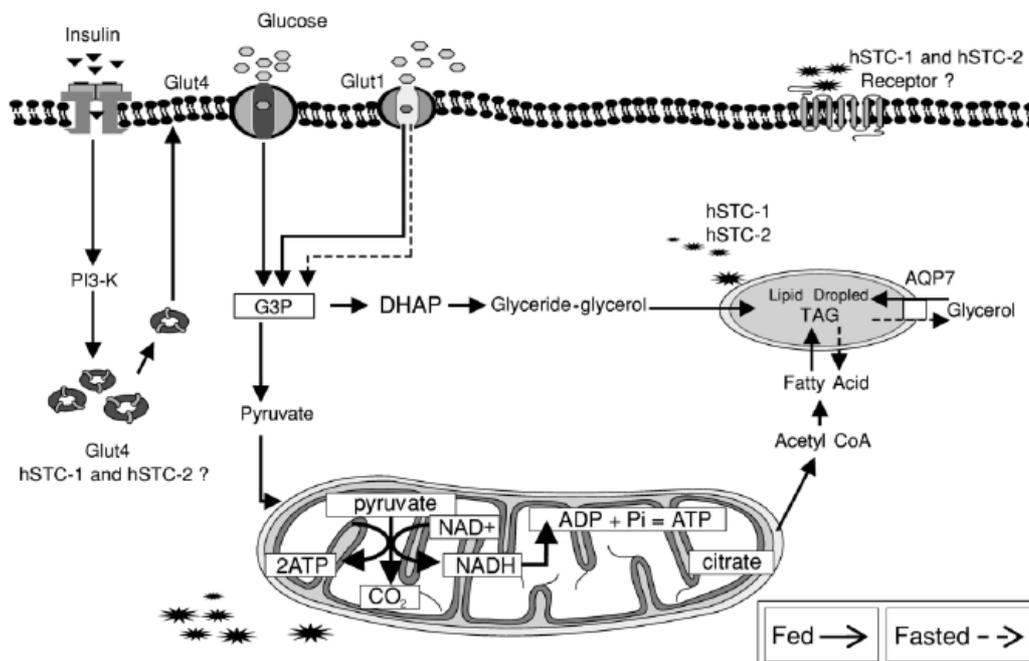


Figura 4: Resumo esquemático do artigo 1.

Efeitos da stanniocalcina humana 1 (hSTC-1) e da stanniocalcina humana 2 (hSTC-2) nos fluxos da glicose e do glicerol no tecido adiposo branco epididimal de ratos alimentados e em jejum de 48h. Linha preenchida, estado alimentado; Linha tracejada jejum 48h. AQP7, aquaporina 7; PI3K, fosfatidilinositol-3-cinase; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; TAG, triacilglicerol; Glut4, transportador de glicose tipo 4; Glut1, transportador de glicose tipo 1; DHAP, fosfato de diidroxiacetona; ATP, trifosfato adenosina;. ADP, difosfato de adenosina; Pi, fosfato inorgânico; NAD^+ nicotinamida adenina dinucleotídeo-oxidado; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo-reduzido; CO_2 , dióxido de carbono

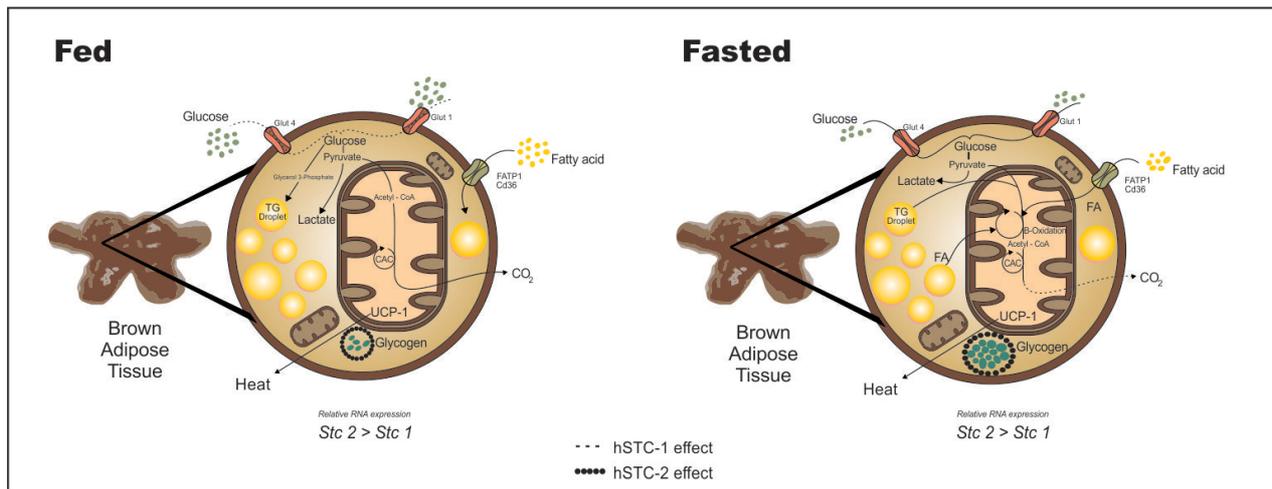


Figura 5: Resumo esquemático do artigo 2.

Efeitos da stanniocalcina humana 1 (hSTC-1) e da stanniocalcina humana 2 (hSTC-2) nos fluxos da glicose e do glicerol no tecido adiposo marrom de ratos alimentados e em jejum de 48h. Linha tracejada, efeito da hSTC-1; Linha tracejada em negrito, efeito da hSTC-2. *Stc1*, gene STC-1; *Stc2*, gene STC-2; UCP-1, proteína desacopladora 1; CO₂, dióxido de carbono; TG, triacilglicerol; FA, ácido graxo; Glut4, transportador de glicose tipo 4; Glut1, Transportador de glicose tipo 1; FATP1, proteína transportadora de ácidos graxos 1; CD36, cluster de diferenciação 36; CAC, ciclo do ácido cítrico.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho abriu novas perspectivas de investigação sobre o papel das STCs no metabolismo das células adiposas brancas e marrons. Um dos pontos que deve ser esclarecido é a ação das STCs sobre os GLUT-1 e 4 em TAB e TAM de ratos em jejum ou alimentados. Determinar se as STCs potencializam a ação da insulina ou agem de forma direta sobre a síntese e a translocação destes transportadores de glicose no TAB e no TAM. Outro aspecto importante da ação das STCs nos tecidos adiposos é formação de lactato. Determinar no TAB e no TAM de ratos em jejum e alimentados a ação das STCs sobre a oxidação de ^{14}C -lactato e a atividade e a expressão da enzima LDH. Além disso, determinar, após a incubação em presença de hSTC-1 ou hSTC-2, nos tecidos adiposos de ratos em jejum e alimentados a expressão dos transportadores de lactato MCT 1 e 4. Por último, investigar o papel da hSTC-2 sobre a síntese de glicogênio no TAM de ratos em jejum e alimentados, determinando a incorporação de ^{14}C -glicose em ^{14}C -glicogênio e a relação das atividades da glicogênio fosforilase/glicogênio sintase. Contudo, as investigações sobre os efeitos metabólicas das STCs estão apenas começando e muitos estudos serão necessários para esclarecer o papel destes hormônios na regulação do metabolismo intermediário em mamíferos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amemiya, Y., Marra, L.E., Reyhani, N., Youson, J.H., 2002. Stanniocalcin from an ancient teleost: A monomeric form of the hormone and a possible extracorporeal distribution. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188, 141–150. doi:10.1016/S0303-7207(01)00741-9
- Barron, C.C., Bilan, P.J., Tsakiridis, T., Tsiani, E., 2016. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism* 65, 124–139. doi:10.1016/j.metabol.2015.10.007
- Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmüller, A., Gordts, P.L.S.M., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., Heeren, J., 2011. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 17, 200–206. doi:10.1038/nm.2297
- Bartness, T.J., Tschöp, M.H., Heppner, K.M., DiMarchi, R., Geary, N., Habegger, K.M., 2010. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 689–697. doi:10.1038/nrendo.2010.187
- Basu, J., Genheimer, C.W., Sangha, N., Quinlan, S.F., Guthrie, K.I., Kelley, R., Ilagan, R.M., Jain, D., Bertram, T., Ludlow, J.W., 2011. Organ specific regenerative markers in peri-organ adipose: kidney. *Lipids Health Dis.* 10, 171. doi:10.1186/1476-511X-10-171
- Bonzón-Kulichenko, E., Moltó, E., Pintado, C., Fernández, A., Arribas, C., Schwudke, D., Gallardo, N., Shevchenko, A., Andrés, A., 2018. Changes in visceral adipose tissue plasma membrane lipid composition in old rats are associated with adipocyte hypertrophy with aging. *Journals Gerontol. - Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* 73, 1139–1146. doi:10.1093/gerona/gly081
- Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Boström, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., Kajimura, S., Zingaretti, M.C., Vind, B.F., Tu, H., Cinti, S., Højlund, K., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., 2012. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481, 463–468. doi:10.1038/nature10777
- Botion, L., Kettelhut, I., Migliorini, R., 1995. Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. *Horm. Metab. Res.* 27, 310–313. doi:10.1055/s-2007-979967
- Brown, E.T., Umino, Y., Loi, T., Solessio, E., Barlow, R., 2005. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C570BL6J mice. *Vis. Neurosci.* 22, 615–618. doi:10.10170S0952523805225105
- Brushia, R.J., Walsh, D.A., 1999. Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure, *Frontiers in Bioscience*.4, 618-641.

- Bueno, D., Azzolin, I., Perry, M.L.S., 1994. Ontogenetic study of glucose and lactate utilisation by rat cerebellum slices. *Med. Sci. Res.* 22, 631–632.
- Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J.R., Wiest, M.M., Watkins, S.M., Hotamisligil, G.S., 2008. Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* 134, 933–944. doi:10.1016/j.cell.2008.07.048
- Carmean, C.M., Cohen, R.N., Brady, M.J., 2014. Systemic regulation of adipose metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1842, 424–430. doi:10.1016/j.bbadis.2013.06.004
- Carmean, C.M., Huang, Y.H., Brady, M.J., 2016. Glycogen repletion in brown adipose tissue upon refeeding is primarily driven by phosphorylation-independent mechanisms. *PLoS One* 11, 1–14. doi:10.1371/journal
- Carpentier, A.C., Blondin, D.P., Virtanen, K.A., Richard, D., Haman, F., Turcotte, E., 2018. Brown adipose tissue energy metabolism in humans. *Front. Endocrinol.* 9, 1–21. doi:10.3389/fendo.2018
- Chang, A.C.M., Reddel, R.R., 1998. Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: Stanniocalcin 2. *Mol. Cell. Endocrinol.* 141, 95–99. doi:10.1016/S0303-7207(98)00097-5
- Chang, A.C.M., Janosi, J., Hulsbeek, M., de Jong, D., Jeffrey, K.J., Noble, J.R., Reddel, R.R., 1995. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 112, 241–247. doi:10.1016/0303-7207(95)03601-3
- Chaves, V.E., Frasson, D., Martins-Santos, M.E.S., Navegantes, L.C.C., Galban, V.D., Garófalo, M.A.R., Kettelhut, I.C., Migliorini, R.H., 2008. Fatty acid synthesis and generation of glycerol-3-phosphate in brown adipose tissue from rats fed a cafeteria diet. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 86, 416–423. doi:10.1139/Y08-052
- Chen, Y., Zeng, X., Huang, X., Serag, S., Woolf, C.J., Spiegelman, B.M., 2017. Crosstalk between KCNK3-mediated ion current and adrenergic signaling regulates adipose thermogenesis and obesity. *Cell* 171, 836–848.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.09.015
- Chusyd, D.E., Wang, D., Huffman, D.M., Nagy, T.R., 2016. Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Front. Nutr.* 3, 1–12. doi:10.3389/fnut.2016.00010
- Comissão Nac. Energ. Nuclear - Gerência de rejeitos radioativos de baixo e médio níveis de radiação (Resolução 167/14), 2014. <http://appasp.cnen.gov.br/seguranca/normas/pdf/Nrm801.pdf> (accessed 5.27.18).

- Cozer, A.G., Trapp, M., Martins, T.L., De Fraga, L.S., Vieira Marques, C., Model, J.F.A., Schein, V., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2017. Effects of Stanniocalcin-1 on glucose flux in rat brown adipose tissue. *Biochimie* 138, 50–55. doi:10.1016/j.biochi.2017.04.008
- Cozer, A.G., Trapp, M., Vieira Marques, C., Martins, T.L., Model, J.F.A., Schein, V., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2016. Stanniocalcin 1 enhances carbon flux from glucose to lipids in white retroperitoneal adipose tissue in the fed rat. *Lipids* 51, 1303–1307. doi:10.1007/s11745-016-4202-5
- Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., Kolodny, G.M., Kahn, C.R., 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *Obstet. Gynecol. Surv.* 64, 519–520. doi:10.1097/OGX.0b013e3181ac8aa2
- Dallner, O.S., Chernogubova, E., Brolinson, K.A., Bengtsson, T., 2006. β 3-adrenergic receptors stimulate glucose uptake in brown adipocytes by two mechanisms independently of glucose transporter 4 translocation. *Endocrinology*. doi:10.1210/en.2006-0242
- De Meis, L., 2003. Brown adipose tissue Ca^{2+} -ATPase: Uncoupled ATP hydrolysis and thermogenic activity. *J. Biol. Chem.* 278, 41856–41861. doi:10.1074/jbc.M308280200
- De Niu, P., Radman, D.P., Jaworski, E.M., Deol, H., Gentz, R., Su, J., Olsen, H.S., Wagner, G.F., 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
- De Paula, F.J.A., Rosen, C.J., 2018. Structure and function of bone marrow adipocytes. *Compr. Physiol.* 8, 315–349. doi:10.1002/cphy.c170010
- Deol, H.K., Varghese, R., Wagner, G.F., Dimattia, G.E., 2000. Dynamic regulation of mouse ovarian stanniocalcin expression during gestation and lactation. *Endocrinology* 141, 3412–3421. doi:10.1210/endo.141.9.7658
- Digiloro, M., Newby F, D., Lovejoy, J., 1992. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. *FASEB J.* 6, 2405–2412.
- DiNuzzo, M., Mangia, S., Maraviglia, B., Giove, F., 2013. Regulatory mechanisms for glycogenolysis and K^+ uptake in brain astrocytes. *Neurochem. Int.* 63, 458–464. doi:10.1016/j.neuint.2013.08.004
- Dodd, G.T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S.E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T.L., Münzberg, H., Zhang, Z.-Y., Kahn, B.B., Neel, B.G., Bence, K.K., Andrews, Z.B., Cowley, M.A., Tiganis, T., 2015. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* 160, 88–104. Doi: 10.1016/j.cell.2014.12.022

- Dos Santos, M.P., De França, S.A., Dos Santos, J.T.F., Buzelle, S.L., Bertolini, G.L., Garófalo, M.A.R., Do Kettelhut, I.C., Frasson, D., Chaves, V.E., Kawashita, N.H., 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
- Dubikovskaya, E., Chudnovskiy, R., Karateev, G., Park, H.M., Stahl, A., 2014. Measurement of long-chain fatty acid uptake into adipocytes. *Methods Enzymol.* 538, 107–134. doi:10.1016/B978-0-12-800280-3.00007
- Duncan, R.E., Ahmadian, M., Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Sul, H.S., 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 79–101. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093734
- Ebner, S., Burnol, A.-F., Ferre, P., Saintaurin, M.-A. De, Girard, J., 1987. Effects of insulin and norepinephrine on glucose transport and metabolism in rat brown adipocytes. *Eur. J. Biochem* 170, 469–474.
- Ellard, J.P., McCudden, C.R., Tanega, C., James, K.A., Ratkovic, S., Staples, J.F., Wagner, G.F., 2007. 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, 90–101. doi:10.1016/j.mce.2006.10.008
- Enerbäck, S., 2010. Human brown adipose tissue. *Cell Metab.* 11, 248–252. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.008
- Escrivá, F., Gavete, M.L., Fermín, Y., Pérez, C., Gallardo, N., Alvarez, C., Andrés, A., Ros, M., Carrascosa, J.M., 2007. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: Role of adiposity. *J. Endocrinol.* 194, 131–141. doi:10.1677/joe.1.07043
- Farkas, V., Kelenyi, G., Sandor, A., 1999. A Dramatic accumulation of glycogen in the brown adipose tissue of rats following recovery from cold exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 54–61. doi:10.1006/abbi.1999.1157
- Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J., 2009. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab.* 9, 203–209. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.014
- Ferreira, G.N., Rossi-Valentim, R., Buzelle, S.L., Paula-Gomes, S., Zanon, N.M., Garófalo, M.A.R., Frasson, D., Navegantes, L.C.C., Chaves, V.E., Kettelhut, I.C., 2017. Differential regulation of glyceroneogenesis by glucocorticoids in epididymal and retroperitoneal white adipose tissue from rats. *Endocrine* 57, 287–297. doi:10.1007/s12020-017-1315-4
- Festuccia, W.T.L., Kawashita, N.H., Garofalo, M.A.R., Moura, M.A.F., Brito, S.R.C., Kettelhut, I.C., Migliorini, R.H., 2003. Control of glyceroneogenic activity in rat

- brown adipose tissue. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol.* 285, R177-182
doi:10.1152/ajpregu.00713
- Festuccia, W.T., Blanchard, P.-G., Deshaies, Y., 2011. Control of brown adipose tissue glucose and lipid metabolism by PPAR γ . *Front. Endocrinol.* 2, 1–6.
doi:10.3389/fendo.2011.00084
- Filvaroff, E.H., Guillet, S., Zlot, C., Bao, M., Ingle, G., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Bunting, S., Ross, J., Carano, R.A.D., Powell-Braxton, L., Wagner, G.F., Eckert, R., Gerritsen, M.E., French, D.M., 2002. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. *Endocrinology* 143, 3681–3690.
doi:10.1210/en.2001-211424
- Fliers, E., Kreier, F., Voshol, P.J., Havekes, L.M., Sauerwein, H.P., Kalsbeek, A., Buijs, R.M., Romijn, J.A., 2003. White adipose tissue: Getting nervous. *J. Neuroendocrinol.* 15, 1005–1010. doi:10.1046/j.13
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fonseca-Alaniz, 2006. Tecido adiposo e regulação metabólica. 217
ArqBrasEndocrinolMetab 50, 216–229. doi:S0004-27302006000200008
- Fontaine, M., 1964. Corpuscles de Stannius et régulation ionique (Ca, K, Na) dumilieu intérieur de l'Anguille (*Anguilla anguilla* L.). *Comptesrendusl'AcadémiedesSci. Ser. D* 259, 875–878
- Frasson, D., Boschini, R.P., Chaves, V.E., Dos Santos, M.E.S.M., Gomes, S.D.P., Valentim, R.R., Garófalo, M.A.R., Navegantes, L.C.C., Migliorini, R.H., Kettelhut, I.D.C., 2012. 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, 1473–1485.
doi:10.1016/j.metabol.2012.03.014
- Gagliardi, A.D., Kuo, E.Y.W., Raulic, S., Wagner, G.F., DiMattia, G.E., 2005. Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E92-105. doi:10.1152/ajpendo.00268.2004
- Giralt, M., Villarroya, F., 2013. White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology* 154, 2992–3000. doi:10.1210/en.2013-1403
- Gonçalves, A. da S., 2012. Efeitos dos hormônios peptídicos Stanniocalcina 1 e Stanniocalcina 2 sobre metabolismo da glicose em ratos. Dissertação de Mestrado- Fisiologia. Departamento de Fisiologia, UFRGS.
- Guerra, C., Navarro, P., Valverde, A.M., Arribas, M., Brüning, J., Kozak, L.P., Kahn, C.R., Benito, M., 2001. Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 108, 1205–1213. doi:10.1172/JCI13103

- Habegger, K.M., Heppner, K.M., Geary, N., Bartness, T.J., DiMarchi, R., Tschop, M.H., 2010. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 689–697. doi: 10.1038/nrendo.2010.187
- Hanson, R.W., Reshef, L., 2003. Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* 85, 1199–1205. doi:10.1016/j.biochi.2003.10.022
- He, Y.-H., Song, Y., Liao, X.-L., Wang, L., Li, G., Alima, Li, Y., Sun, C.-H., 2011. The calcium-sensing receptor affects fat accumulation via effects on antilipolytic pathways in adipose tissue of rats fed low-calcium diets. *J. Nutr.* 141, 1938–1946. doi:10.3945/jn.111.141762
- Hibuse, T., Maeda, N., Nagasawa, A., Funahashi, T., 2006. Aquaporins and glycerol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758, 1004–1011. doi:10.1016/j.bbamem.2006.01.008
- Himms-Hagen, J., 2011. Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 394–401. doi:10.1139/y89-063
- Hjortebjerg, R., Berryman, D.E., Comisford, R., List, E.O., Oxvig, C., Bjerre, M., Frystyk, J., Kopchick, J.J., 2018. Depot-specific and GH-dependent regulation of IGF binding protein-4, pregnancy-associated plasma protein-A, and stanniocalcin-2 in murine adipose tissue. *Growth Horm. IGF Res.* 39, 54–61. doi:10.1016/j.ghir.2018.01.001
- Ho, C., Conner, D.A., Pollak, M.R., Ladd, D.J., Kifor, O., Warren, H.B., Brown, E.M., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 1995. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat. Genet.* 11, 389–394. doi:10.1038/ng1295-389
- Holm, C., 2003. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1120–1124. doi:10.1042/bst0311120
- Hou, J., Wang, Z., Xu, H., Yang, L., Yu, X., Yang, Z., Deng, Y., Meng, J., Feng, Y., Guo, X., Yang, G., 2015. Stanniocalcin 2 suppresses breast cancer cell migration and invasion via the PKC/Claudin-1-mediated signaling. *PLoS One* 10, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0122179
- Jakus, P.B., Sandor, A., Janaky, T., Farkas, V., 2008. Cooperation between BAT and WAT of rats in thermogenesis in response to cold, and the mechanism of glycogen accumulation in BAT during reacclimation. *J. Lipid Res.* 49, 332–339. doi:10.1194/jlr.M700316-JLR200
- Jansson, P.A., Larsson, A., Smith, U., Lönnroth, P., 1994. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. *J. Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI116951

- Jiao, Y., Zhao, J., Shi, G., Liu, X., Xiong, X., Li, X., Zhang, H., Ma, Q., Lu, Y., 2017. Stanniocalcin2 acts as an anorectic factor through activation of STAT3 pathway. *Oncotarget* 8, 91067–91075. doi:10.18632/oncotarget.19412
- Juhanson, P., Rull, K., Kikas, T., Laivuori, H., Vaas, P., Kajantie, E., Heinonen, S., Laan, M., 2016. Stanniocalcin-1 hormone in nonpreeclamptic and preeclamptic pregnancy: Clinical, life-style, and genetic modulators. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 4799–4807. doi:10.1210/jc.2016-1873
- Kaiser De Souza, D., De Souza, F.A., Stürmer De Fraga, L., Konrad, S.P., Belló-Klein, A., Silveira Martins Da Silva, R., Carlos, L., Kucharski, R., 2013. Visceral adiposity influences glucose and glycogen metabolism in control and hyperlipidic-fed animals. *Nutr Hosp* 28, 545–552. doi:10.3305/nh.2013.28.2.6181
- Kalinovich, A. V., de Jong, J.M.A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2017. UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie* 134, 127–137. doi:10.1016/j.biochi.2017.01.007
- Kawashita, N.H., Brito, M.N., Brito, S.R., Moura, M.A., Festuccia, W.T., Garofalo, M.A., Machado, U.F., Kettelhut, I.C., Migliorini, R.H., 2002. Glucose uptake, glucose transporter GLUT4, and glycolytic enzymes in brown adipose tissue from rats adapted to a high-protein diet. *Metabolism*. 51, 1501–1505. doi:10.1053/meta.2002.35582
- Keuper, M., Jastroch, M., Yi, C.X., Fischer-Posovszky, P., Wabitsch, M., Tschöp, M.H., Hofmann, S.M., 2014. Spare mitochondrial respiratory capacity permits human adipocytes to maintain ATP homeostasis under hypoglycemic conditions. *FASEB J.* doi:10.1096/fj.13-238725
- Kim, P.H., Na, S.S., Lee, B., Kim, J.H., Cho, J.Y., 2015. Stanniocalcin 2 enhances mesenchymal stem cell survival by suppressing oxidative stress. *BMB Rep.* 48, 702–707. doi:10.5483/BMBRep.2015.48.12.158
- Kimmel, A.R., Sztalryd, C., 2016. The Perilipins: Major cytosolic lipid droplet-associated proteins and their roles in cellular lipid storage, mobilization, and systemic homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 36, 471-509. doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105410
- Labbé, S.M., Caron, A., Bakan, I., Laplante, M., Carpentier, A.C., Lecomte, R., Richard, D., 2015. In vivo measurement of energy substrate contribution to cold-induced brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB J.* 29, 2046–2058. doi:10.1096/fj.14-266247
- Lafeber, F.P.J.G., Perry, S.F., 1988. Experimental hypercalcemia induces hypocalcin release and inhibits branchial Ca⁺ influx in freshwater trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 72, 136–143. doi:10.1016/0016-6480(88)90189-X

- Law, A.Y., Wong, C.K., Turner, J., Gonzalez, A.A., Prieto, M.C., Wagner, G.F., 2012. Vasopressin controls stanniocalcin-1 gene expression in rat and mouse kidney. *Mol. Cell. Endocrinol.* 348, 183–188. doi:10.1016/j.mce.2011.08.005
- Lee, P., Bova, R., Schofield, L., Bryant, W., Dieckmann, W., Slattery, A., Govendir, M.A., Emmett, L., Greenfield, J.R., 2016. Brown adipose tissue exhibits a glucose-responsive thermogenic biorhythm in humans. *Cell Metab.* 23, 602–609. doi:10.1016/j.cmet.2016.02.007
- Leung, C.C., Wong, C.K., 2018. Effects of STC1 overexpression on tumorigenicity and metabolism of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 9, 6852–6861. doi:10.18632/oncotarget.23566
- Li, Y., He, Z.C., Zhang, X.N., Liu, Q., Chen, C., Zhu, Z., Chen, Q., Shi, Y., Yao, X.H., Cui, Y.H., Zhang, X., Wang, Y., Kung, H.F., Ping, Y.F., Bian, X.W., 2018. Stanniocalcin-1 augments stem-like traits of glioblastoma cells through binding and activating NOTCH1. *Cancer Lett.* 416, 66–74. doi:10.1016/j.canlet.2017.11.033
- Lin, C.H., Su, C.H., Hwang, P.P., 2014. Calcium-Sensing receptor mediates Ca²⁺ homeostasis by modulating expression of PTH and stanniocalcin. *Endocrinology* 155, 56–67. doi:10.1210/en.2013-1608
- Lobo, S., Wiczer, B.M., Smith, A.J., Hall, A.M., Bernlohr, D.A., 2007. Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. *J. Lipid Res.* 48, 609–620. doi:10.1194/jlr.M600441-JLR200
- López, J.J., Jardín, I., Cantonero Chamorro, C., Duran, M.L., Tarancón Rubio, M.J., Reyes Panadero, M., Jiménez, F., Montero, R., González, M.J., Martínez, M., Hernández, M.J., Brull, J.M., Corbacho, A.J., Delgado, E., Granados, M.P., Gómez-Gordo, L., Rosado, J.A., Redondo, P.C., 2018. Involvement of stanniocalcins in the deregulation of glycaemia in obese mice and type 2 diabetic patients. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 684–694. doi:10.1111/jcmm.13355
- Luo, L., Liu, M., 2016. Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* 231, R77–R99. doi:10.1530/JOE-16-0211
- Martins-Santos, M.E.S., Chaves, V.E., Frasson, D., Boschini, R.P., Garófalo, M.A.R., Kettelhut, I. do C., Migliorini, R.H., 2007. Glyceroneogenesis and the supply of glycerol-3-phosphate for glyceride-glycerol synthesis in liver slices of fasted and diabetic rats. *Am. J. Physiol. Metab.* 293, E1352–E1357. doi:10.1152/ajpendo.00394.2007
- McCudden, C.R., James, K.A., Hasilo, C., Wagner, G.F., 2002. Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 45249–45258. doi:10.1074/jbc.m205954200
- McMahon, R.J., Frost, S.C., 1995. Nutrient control of GLUT1 processing and turnover in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 12094–12099. doi:10.1074/jbc.270.20.12094

- Moore, E.E., Kuestner, R.E., Conklin, D.C., Whitmore, T.E., Downey, W., Buddle, M.M., Adams, R.L., Bell, L.A., Thompson, D.L., Wolf, A., Chen, L., Stamm, M.R., Grant, F.J., Lok, S., Ren, H., De Jongh, K.S., 1999. Stanniocalcin 2: Characterization of the protein and its localization to human pancreatic alpha cells. *Horm. Metab. Res.* 31, 406–414. doi:10.1055/s-2007-978764
- Nielsen, T.S., Jessen, N., Jørgensen, J.O.L., Møller, N., Lund, S., 2014. Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *J. Mol. Endocrinol.* 52, R199–R222. doi:10.1530/JME-13-0277
- Olsen, H.S., Cepeda, M.A., Zhang, Q.Q., Rosen, C.A., Vozzolo, B.L., 2002. Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 1792–1796. doi:10.1073/pnas.93.5.1792
- Paciga, M., Hirvi, E.R., James, K., Wagner, G.F., 2005. Characterization of big stanniocalcin variants in mammalian adipocytes and adrenocortical cells. *Am. J. Physiol. Metab.* 289, E197–E205. doi:10.1152/ajpendo.00581.2004
- Paciga, M., McCudden, C.R., Londos, C., DiMattia, G.E., Wagner, G.F., 2003. Targeting of big stanniocalcin and its receptor to lipid storage droplets of ovarian steroidogenic cells. *J. Biol. Chem.* 278, 49549–49554. doi:10.1074/jbc.M307302200
- Palma, P.F.S., Bock, C., Silva, T.S., Guerreiro, P.M., Power, D.M., Pörtner, H. O., Canário, A.V.M., 2019. STC1 and PTHrP modify carbohydrate and lipid metabolism in liver of a teleost fish. *Sci. Rep.* 9, 723. doi:10.1038/s41598-018-36821-2
- Pang, P.K.T., Pang, R.K., 1974. Environmental calcium and hypocalcin activity in the Stannius corpuscles of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Gen. Comp. Endocrinol.* 23, 239–241. doi: 10.1016/0016-6480(74)90133-6
- Petersen, C., Nielsen, M.D., Andersen, E.S., Basse, A.L., Isidor, M.S., Markussen, L.K., Viuff, B.M., Lambert, I.H., Hansen, J.B., Pedersen, S.F., 2017. MCT1 and MCT4 expression and lactate flux activity increase during white and brown adipogenesis and impact adipocyte metabolism. *Sci. Rep.* 7, 13101. doi:10.1038/s41598-017-13298-z
- Petersen, M.C., Shulman, G.I., 2018. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev* 98, 2133–2223. doi:10.1152/physrev
- Proença, A.R.G., Sertié, R.A.L., Oliveira, A.C., Campaã, A.B., Caminhoto, R.O., Chimin, P., Lima, F.B., 2014. New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 47, 192–205. doi: 10.1590/1414-431X20132911
- Roach, P., 2002. Glycogen and its metabolism. *Curr. Mol. Med.* 2, 101–120. doi:10.2174/1566524024605761

- Rodríguez, A., Marinelli, R.A., Tesse, A., Frühbeck, G., Calamita, G., 2015. Sexual dimorphism of adipose and hepatic aquaglyceroporins in health and metabolic disorders. *Front. Endocrinol.* 6, 1–7. doi: 10.3389/fendo.2015.00171
- Rosen, E.D., Spiegelman, B.M., 2014. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156, 20–44. doi:10.1016/j.cell.2013.12.012
- Rotondo, F., Ho-Palma, A.C., Remesar, X., Fernández-López, J.A., Romero, M.D.M., Alemany, M., 2017. Glycerol is synthesized and secreted by adipocytes to dispose of excess glucose, via glycerogenesis and increased acyl-glycerol turnover. *Sci. Rep.* 7, 8983. doi:10.1038/s41598-017-09450-4
- Rui, L., 2017. Brown and beige adipose tissues in health and disease. *Compr. Physiol.* 7, 1281–1306. doi:10.1002/cphy.c170001
- Sabater, D., Arriarán, S., Romero, M.D.M., Agnelli, S., Remesar, X., Fernández-López, J.A., Alemany, M., 2014. Cultured 3T3L1 adipocytes dispose of excess medium glucose as lactate under abundant oxygen availability. *Sci. Rep.* 4, 1–9. doi:10.1038/srep03663
- Saha, J.K., Xia, J., Grondin, J.M., Engle, S.K., Jakubowski, J.A., 2005. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: Mechanisms and implications for preclinical models. *Exp. Biol. Med.* 230, 777–784. doi:10.1177/153537020523001012
- Sanchez-Gurmaches, J., Tang, Y., Jespersen, N.Z., Wallace, M., Martinez Calejman, C., Gujja, S., Li, H., Edwards, Y.J.K., Wolfrum, C., Metallo, C.M., Nielsen, S., Scheele, C., Guertin, D.A., 2018. Brown fat AKT2 is a cold-induced kinase that stimulates ChREBP-mediated de novo lipogenesis to optimize fuel storage and thermogenesis. *CellMetab.* 27, 195–209.e6. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.008
- Sarapio, E., 2014. Estudo da ação do hormônio peptídico Stanniocalcina sobre o metabolismo de lipídios. Dissertação de Mestrado - Fisiologia. Departamento de Fisiologia, UFRGS.
- Sazonova, O., James, K.A., McCudden, C.R., Segal, D., Talebian, A., Wagner, G.F., 2008. Stanniocalcin-1 secretion and receptor regulation in kidney cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* 294, F788–F794. doi:10.1152/ajprenal.00553.2007
- Schein, V., Kucharski, L.C., Guerreiro, P.M.G., Martins, T.L., Morgado, I., Power, D.M., Canario, A.V.M., da Silva, R.S.M., 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
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Schwenk, R.W., Holloway, G.P., Luiken, J.J.F.P., Bonen, A., Glatz, J.F.C., 2010. Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid

- transporters. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 82, 149–154. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.029
- Serlachius, M., Andersson, L.C., 2004. Upregulated expression of stanniocalcin-1 during adipogenesis. *Exp. Cell Res.* 296, 256–264. doi:10.1016/j.yexcr.2004.02.016
- Serlachius, M., Zhang, K., Andersson, L.C., 2004. Stanniocalcin in terminally differentiated mammalian cells. *Peptides* 25, 1657–1662. doi:10.1016/j.peptides.2004.03.031
- Shibata, H., Pérusse, F., Vallerand, A., Bukowiecki, L.J., 1989. Cold exposure reverses inhibitory effects of fasting on peripheral glucose uptake in rats. *Am. J. Physiol.* 257, R96-101. doi:10.1152/ajpregu.1989.257.1.R96
- So, Y.-P., Fenwick, J.C., 1977. Relationship between net ⁴⁵calcium influx across a perfused isolated eel gill and the development of post-stanniectomy hypercalcemia. *J. Exp. Zool.* 200, 259–264. doi: 10.1002/jez.1402000207
- Song, Z., Xiaoli, A., Yang, F., 2018. Regulation and metabolic significance of de novo lipogenesis in adipose tissues. *Nutrients* 10, 1383. doi:10.3390/nu10101383
- Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M.D., Kirkland, J.L., 2013. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *CellMetab.* 17, 644–656. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.008
- Teruel, T., Valverde, A.M., Benito, M., Lorenzo, M., 1996. Insulin-like growth factor I and insulin induce adipogenic-related gene expression in fetal brown adipocyte primary cultures, *Biochem. J.* 319, 627-632. doi: 10.1042/bj3190627
- Thompson, B.R., Lobo, S., Bernlohr, D.A., 2010. Fatty acid flux in adipocytes: The in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol. Cell. Endocrinol.* 318, 24–33. doi:10.1016/j.mce.2009.08.015
- Thoonen, R., Hindle, A.G., Scherrer-Crosbie, M., 2016. Brown adipose tissue: The heat is on the heart. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 310, H1592–H1605. doi:10.1152/ajpheart.00698.2015
- Thorens, B., Mueckler, M., 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *Am. J. Physiol. Metab.* 298, E141–E145. doi:10.1152/ajpendo.00712.2009
- Tordjman, K.M., Leingang, K. a, Mueckler, M., 1990. Differential regulation of the HepG2 and adipocyte/muscle glucose transporters in 3T3L1 adipocytes. Effect of chronic glucose deprivation. *Biochem. J.* 271, 201–7. doi:10.1042/bj2710201
- Tubbs, E., Theurey, P., Vial, G., Bendridi, N., Bravard, A., Chauvin, M.A., Ji-Cao, J., Zoulim, F., Bartosch, B., Ovize, M., Vidal, H., Rieusset, J., 2014. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for

- insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 63, 3279-3294. doi:10.2337/db13-1751
- Valverde, A.M., Arribas, M., Mur, C., Navarro, P., Pons, S., Cassard-Doulcier, A.M., Kahn, C.R., Benito, M., 2003. Insulin-induced up-regulated uncoupling protein-1 expression is mediated by insulin receptor substrate 1 through the phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway in fetal brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 10221–10231. doi:10.1074/jbc.M209363200
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11, 256–265. doi:10.1016/0003-2697(65)90013-8
- Villarroya, J., Cereijo, R., Villarroya, F., 2013. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E567-E572. doi:10.1152/ajpendo.00250.2013
- Wagner, G.F., Guiraudon, C.C., Milliken, C., Copp, D.H., 1995. Immunological and biological evidence for a stanniocalcin-like hormone in human kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 1871–1875. doi:10.1073/pnas.92.6.1871
- Wagner, G.F., 1994. The molecular biology of the corpuscles of Stannius and regulation of Stanniocalcin gene expression. *Fish Physiol.* 13, 273–306. doi:10.1016/S1546-5098(08)60070-9
- Watt, M.J., Spriet, L.L., 2010. Triacylglycerol lipases and metabolic control: implications for health and disease. *Am. J. Physiol. Metab.* 299, E162–E168. doi:10.1152/ajpendo.00698.2009
- Winther, S., Isidor, M.S., Basse, A.L., Skjoldborg, N., Cheung, A., Quistorff, B., Hansen, J.B., 2017. Restricting glycolysis impairs brown adipocyte glucose and oxygen consumption. *Am. J. Physiol. Metab.* 314, E214–E223. doi:10.1152/ajpendo.00218.2017
- Worrall, D.S., Olefsky, J.M., 2014. The effects of intracellular calcium depletion on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol.* 16, 378–389. doi:10.1210/mend.16.2.0776
- Wu, J., Cohen, P., Spiegelman, B.M., 2013. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes Dev.* 27, 234–250. doi:10.1101/gad.211649.112
- Yan, N., 2017. A glimpse of membrane transport through structures - advances in the structural biology of the GLUT glucose transporters. *J. Mol. Biol.* 429, 2710–2725. doi:10.1016/j.jmb.2017.07.009
- Yeung, B.H.Y., Law, A.Y.S., Wong, C.K.C., 2012. Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 272–280. doi:10.1016/j.mce.2011.11.007

- Zaidi, D., Turner, J.K., Durst, M.A., Wagner, G.F., 2012. Stanniocalcin-1 co-localizes with insulin in the pancreatic islets. *ISRN Endocrinol.* 2012, 1–6. doi:10.5402/2012/834359
- Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., Lass, A., 2009. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J. Lipid Res.* 50, 3–21. doi:10.1194/jlr.R80003
- Zeiger, W., Ito, D., Swetlik, C., Oh-hora, M., Villereal, M.L., Thinakaran, G., 2011. Stanniocalcin 2 is a negative modulator of store-operated calcium entry. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3710–3722. doi:10.1128/mcb.05140-11
- Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q., Zhu, Y., Kusminski, C.M., Hassan, G., Gupta, R.K., Zhai, Q., Sun, X., Scherer, P.E., Oz, O.K., 2018. An adipose tissue atlas: an image-guided identification of human-like BAT and beige depots in rodents. *Cell Metab.* 27, 252–262. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.004
- Zhang, K -Z., Lindsberg, P.J., Tatlisumak, T., Kaste, M., Olsen, H.S., Andersson, L.C., 2000. Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3637–3642. doi:10.1073/pnas.97.7.3637
- Zwick, R.K., Guerrero-Juarez, C.F., Horsley, V., Plikus, M. V., 2018. Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. *Cell Metab.* 27, 68–83. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.002

ANEXO I - Comprovante de aprovação ética do estudo



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27534

Título: AÇÃO DOS HORMONIOS STANNIOCALCINAS SOBRE O METABOLISMO DE LÍPIDIOS EM RATOS SUBMETIDOS AO JEJUM

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ROSELIS SILVEIRA MARTINS DA SILVA - coordenador desde 01/10/2014

MARCIA TRAPP - pesquisador desde 01/10/2014

Elaine Sarapio - Aluno de Doutorado desde 01/10/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 09/03/2015 - NA SALA MULTIUSO DA BIBLIOTECA CENTRAL, TÉRREO DO PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 120 ratos machos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 19 de Março de 2015

CRISTIANE MATTE

Vice Coordenador da comissão de ética

ANEXO II – Artigos completos**Artigo aceito:**

Stanniocalcin-1 and -2 effects on glucose and lipid metabolism in white adipose tissue from fed and fasted rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.

DOI: 10.1139/cjpp-2019-0023

Artigo publicado:

Effects of Stanniocalcin hormones on rat brown adipose tissue metabolism under fed and fasted conditions. Molecular and Cellular Endocrinology 485 (2019) 81- 87.

DOI: 10.1016/j.mce.2019.02.004