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

ELAINE SARAPIO

ESTUDO DA AÇÃO DO HORMÔNIO PEPTÍDICO STANNIOCALCINA SOBRE O METABOLISMO DE LIPIDÍOS

Porto Alegre, 2014

Elaine Sarapio

ESTUDO DA AÇÃO DO HORMÔNIO PEPTÍDICO STANNIOCALCINA SOBRE O METABOLISMO DE LIPIDÍOS

Dissertação 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 Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientadora: Prof. Dra. Márcia Trapp

Porto Alegre, 2014

Elaine Sarapio

ESTUDO DA AÇÃO DO HORMÔNIO PEPTÍDICO STANNIOCALCINA SOBRE O METABOLISMO DE LIPIDÍOS

Dissertação 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 Mestre.

Aprovada em 14/03/2014

Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo
Departamento de Fisiologia – UFRGS

Prof. Dra. Vera Trindade
Departamento de Bioquímica – UFRGS

Prof. Dra. Leida Maria Botion
Departamento de Fisiologia e Biofísica - UFMG

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Selmita e José, por todo amor e carinho dedicados, pelo incentivo de seguir em frente, pelo rumo certo a trilhar.

A minha querida família, pelas risadas e pela união.

Ao Gabriel, pelo amor, por ser meu porto seguro.

A Gabriela pela irmandade.

Ao Jeferson Ferraz e Renato Ramos pela amizade.

Aos colegas e professores do LaMEC, agradeço pelo convívio e amizade, pela ajuda nos experimentos, especialmente ao Samir, Tiago, Jorge, Jordana e Priscila. Ao professor Luiz Kucharski, pelos ensinamentos, pela alegria.

Ao meu primeiro professor de Fisiologia, Alberto Rasia, agradeço pelo amor e carinho.

As minhas queridas orientadoras, Roselis Silveira Martins da Silva e Márcia Trapp, pelo acolhimento, pela confiança, pelo carinho e pelos valiosos ensinamentos.

Eles passarão...Eu passarinho!

MARIO QUINTANA

RESUMO

SARAPIO, E. **Estudo da Ação do Hormônio Peptídico Stanniocalcina sobre o Metabolismo de Lipidíos**. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado) – PPG Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

As stanniocalcinas (STC1 e STC2) são hormônios glicoproteicos identificados primeiramente em peixes ósseos, relacionados com o metabolismo do cálcio e fosfato. Recentes descobertas evidenciaram que as funções das STCs foram mantidas em mamíferos. A descoberta da localização do receptor para STC1 na membrana mitocondrial de roedores e sua ação como desacopladora da respiração celular sinalizam fortemente um importante papel desse hormônio no metabolismo intermediário de mamíferos. A STC estimula a lipogênese no tecido hepático e muscular de ratos, porém, suas ações sobre o metabolismo do tecido adiposo ainda não foram esclarecidas. No presente trabalho, estudamos o efeito, *in vitro,* da STC1 e da STC2 humanas, nas concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) no tecido adiposo branco (TAB) e no tecido adiposo marrom (TAM) em *Rattus norvegicus* machos, 300 ± 50g, alimentados *ad libitum* e submetidos ao jejum de 24 e 48 horas (n=61). Os resultados obtidos demonstram que, no TAB, a STC1 não apresentou efeito. Contudo, a STC2, nas concentrações A e C, diminuiu a formação de $^{14}CO_2$ em animais em jejum de 24 horas e nas concentrações A e B, aumentou a incorporação de [2^{14}C] piruvato em ^{14}C-glicerol, em animais alimentados (controle). No TAM, a STC1 na concentração B, diminuiu a formação de $^{14}CO_2$ em animais alimentados (controle). Na mesma concentração, aumentou a incorporação de [2^{14}C] piruvato em ^{14}C-glicerol em animais em jejum de 24 horas e aumentou a incorporação de ^{14}C-ácido graxo em animais alimentados (controle). A STC2, na concentração B, diminuiu a formação de $^{14}CO_2$ em animais alimentados (controle) e aumentou a formação de $^{14}CO_2$ nos animais em jejum de 24 horas. A STC2 não alterou a via gliceroneogênica neste tecido. A dosagem plasmática do hormônio leptina apresentou acentuada diminuição no grupo jejum 48 horas. As STCs 1 e 2, nas concentrações utilizadas, não alteraram a atividade da enzima PEPCKc nos tecidos estudados (TAB e TAM), em animais alimentados (controle). Em quase todos os tratamentos observamos diferenças marcantes entre animais alimentados e jejuados. Este é o primeiro estudo que mostra as diferentes concentrações das STCs no metabolismo de lipídios. **Palavras-chave: Stanniocalcina, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom,gliceroneogênese**

ABSTRACT

SARAPIO, E. **Study of the Stanniocalcin Peptide Hormone Action on Lipid Metabolism.** 2014. 98 s. Dissertation (Master Degree) – PPG Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

The stanniocalcins (STC1 and STC2) are glycoprotein hormones related to the metabolism of calcium and phosphate first identified in fish bone. Recent findings showed that the functions of STCs were maintained in mammals. The discovery of the location of the receptor for STC1 in the mitochondrial membrane, as well as its uncoupling action of cellular respiration in rodents, strongly indicate an important role of this hormone in the intermediary metabolism of mammals. The STC stimulates lipogenesis in the liver and muscle tissue of rats. However, its action on the metabolism of adipose tissue has not yet been clarified. In this work, we studied the effect *in vitro* of human STC1 and STC2 concentrations (A: 0,01 ng/ml, B: 0,1 ng/ml, C: 10ng/mL) in white adipose tissue (WAT) and in brown adipose tissue (BAT) in male *Rattus norvegicus* , 300 ± 50 g , fed *ad libitum* and fasted for 24 and 48 hours (n= 61). The results show that in the WAT, the STC1 had no effect. However, STC2 at concentrations A and C decreased the formation of $^{14}CO_2$ in fasted rats for 24 hours and the concentrations A and B increased the incorporation of [2^{14}C] into ^{14}C-glycerol pyruvate in fed animals (control). In BAT, STC1 concentration B, decreased the formation of $^{14}CO_2$ in fed animals (control). At the same concentration, increased the incorporation of [2 ^{14}C] pyruvate into ^{14}C-glycerol in fasted rats for 24 hours and increased the incorporation of ^{14}C-fatty acid in fed animals (control). The STC2 concentration B decreased the formation of $^{14}CO_2$ in fed animals (control) and increased the formation of $^{14}CO_2$ in animals fasted for 24 hours. The STC2 did not alter the glyceroneogenesis pathway in this tissue. The serum levels of leptin showed marked decrease in the group fasting for 48 hours. The STCs 1 and 2, in the concentrations used, did not alter the PEPCKc enzyme activity in the tissues studied (WAT and BAT) in fed animals (control). In almost all treatments we observed striking differences between fed and fasted animals. This is the first study that shows the effect of different concentrations of STCs in the metabolism of lipids.

Keywords: stanniocalcin, white adipose tissue, brown adipose tissue, Glyceroneogenesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da UCP1 e cadeia respiratória..... 28

Figura 2 - Origens das células adiposas. Precursor do tecido adiposo marrom, branco e bege 30

Figura 3 - Fontes de glicerol-3-fosfato nos adipócitos branco e marrom..... 31

Figura 4 - Regulação da via gliceroneogênica..... 35

Figura 5 - Representação da localização do Corpúsculo de Stannius em peixes 38

Figura 6 - Oxidação de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC1 57

Figura 7 - Oxidação de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC2 58

Figura 8 - Formação de glicerol a partir [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC1 59

Figura 9 - Formação de glicerol a partir [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC2 60

Figura 10 - Formação de ácido graxo a partir [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus* em animais controle (alimentados) e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC1 61

Figura 11 - Formação de ácido graxo a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus* em animais controle (alimentados) e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC2 62

Figura 12 - Relação entre a formação de ^{14}C-glicerol e a formação de ^{14}C-ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus*, incubado com diferentes concentrações de STC1 63

Figura 13 - Relação entre a formação de ^{14}C-glicerol e a formação de ^{14}C-ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus*, incubado com diferentes concentrações de STC2 64

Figura 14 - Atividade da enzima PEPCKc no tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus* em animais controle (alimentados) na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 e STC2 65

Figura 15 - Oxidação de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 66

Figura 16 - Oxidação de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC2 67

Figura 17 - Formação de glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 68

Figura 18 - Formação de glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC2 69

Figura 19 - Formação de ácido graxo a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 70

Figura 20 - Formação de ácido graxo a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC2 71

Figura 21 - Relação entre a formação de ^{14}C-glicerol e a formação de ^{14}C-ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* alimentados e em jejum de 24 e 48 horas incubados com STC1 72

Figura 22 - Relação entre a formação de ^{14}C-glicerol e a formação de ^{14}C-ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* alimentados e em jejum de 24 e 48 horas incubados com STC2 73

Figura 23 - Atividade da enzima PEPCKc no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* de animais controle/alimentados na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 e STC2 74

Figura 24 - Dosagem sérica de glicose em *Rattus norvegicus* de animais controle (alimentados) ou submetidos ao jejum de 24 e 48 horas 75

Figura 25 - Dosagem sérica do hormônio leptina em *Rattus norvegicus* de animais controle (alimentados) ou submetidos ao jejum de 24 e 48 horas 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biomoléculas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo branco..... 21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil CoA	Acetil coenzima A
AG	Ácido graxo
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATGL	Lipase de triacílglicerol do adipócito
ATP	Adenosina trifosfato
DAG	Diacílglicerol
G3P	Glicerol 3 fosfato
GK	Glicerocinase
LHS	Lipase hormônio sensível
LLP	Lipase lipoproteíca
MAG	monoacílglicerol
PKA	Proteína cinase A
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom

TABG	Tecido adiposo bege
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
PEPCKc	Fosfoenol piruvato carboxicinase citosólica
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
POPOP	1,4- Bis benzeno
PPO	2,5- Diphenylloxazole
PPARy	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomas do tipo y.
Myf-5	Fator miogênico marcação – 5
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
UCP 1	Termogenina, proteína desacoplador

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µCi	Microcurrie
µg	Microgramas
µL	Microlitros
Ca^{+2}	Íon Cálcio
CO_2	Dióxido de Carbono
Dpm	Desintegrações por minuto
g	Grama
H_2O	Água
K^+	Íon Potássio
Kcal	Kilocaloria
KDa	Kilodalton
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mmol	Milimol
Na^+	Íon Sódio
ng	nanogramas
O_2	Gás Oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico ou de hidrogênio
Pi	Fosfato Inorgânico
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade
x g	Gravidades

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

1.1 O Tecido Adiposo Branco 20

1.2 O Tecido Adiposo Marrom 26

1.3 O Tecido Adiposo Bege 29

1.4 A Via Gliceroneogênica 31

1.5 Stanniocalcinas (STCs) 36

1.5.1 Funções Biológicas da STC1 e STC2 em Mamíferos 41

1.5.2 Evidências do Papel das STCs sobre o Metabolismo Intermediário em Mamíferos 42

2. OBJETIVOS 46

2.1 Objetivo Geral 46

2.2 Objetivos Específicos 46

3. MATERIAL E MÉTODOS 47

3.1 Animais 47

3.2 Procedimentos Experimentais 48

3.3 Formação de $^{14}CO_2$ a partir de [2-^{14}C]- piruvato 49

3.4 Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol e ^{14}C-ácido graxo 51

3.5 Determinação da atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK (E.C. 4.1.1.32)) 52

3.6 Análises Bioquímicas 54

3.7 Análise Estatística 54

3.8 Proteção ao Pesquisador 55

3.9 Tratamento de Resíduos 55

4. RESULTADOS 57

4.1 **Ações da STC1 e da STC2 sobre o tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus*** 57

4.1.1 Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC1 sobre a oxidação de [2-^{14}C]- piruvato em $^{14}CO_2$ 57

4.1.2 Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC2 sobre a oxidação de [2-^{14}C]- piruvato em $^{14}CO_2$ 58

4.1.3 Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC1 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol 59

4.1.4 Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC2 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol 60

4.1.5 Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC1 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo 61

4.1.6 Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC2 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo 62

4.1.7 Relação entre formação de glicerol e formação de ácidos graxos entre as diferentes concentrações da STC1 63

4.1.8 Relação entre formação de glicerol e formação de ácidos graxos entre as diferentes concentrações da STC2 64

4.1.9 Estudo *in vitro* da ação da STC1 e STC2 sobre a atividade da enzima PEPCK através da incorporaçãoo de $H^{14}CO_3$ em oxaloacetato 65

4.2 **Ações da STC1 e da STC2 sobre o tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus*** 66

4.2.1 Estudo *in vitro* da ação da STC1 sobre a oxidação de 2^{14}C- piruvato em $^{14}CO_2$ 66

4.2.2 Estudo *in vitro* da ação da STC2 sobre a oxidação de 2^{14}C- piruvato em $^{14}CO_2$ 67

4.2.3 Estudo *in vitro* da ação da STC1 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol 68

4.2.4 Estudo *in vitro* da ação da STC2 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol 69

4.2.5 Estudo *in vitro* da ação da STC1 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo 70

4.2.6 Estudo *in vitro* da ação da STC2 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo 71

4.2.7 Relação entre formação de glicerol e formação de ácidos graxos na STC1 72

4.2.8 Relação entre formação de glicerol e formação de ácidos graxos na STC2 73

4.2.9 Estudo *in vitro* da ação da STC1 e STC2 sobre a atividade da enzima PEPCK através da incorporaçãoo de $H^{14}CO_3$ em oxaloacetato 74

4.3 **Dosagens séricas bioquímicas e hormonais** 75

4.3.1 Avaliação da glicemia 75

4.3.2 Avaliação do hormônio Leptina 76

5. DISCUSSÃO 77

5.1 Ações da STC1 e da STC2 sobre o tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus* 78

5.2 Ações da STC1 e da STC2 sobre o tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* 82

6. CONCLUSÕES 85

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

APÊNDICE 98

1. INTRODUÇÃO

1.1. O TECIDO ADIPOSO BRANCO

Três tipos de tecido adiposo são encontrados em mamíferos: o tecido adiposo branco (TAB), o tecido adiposo bege (TABG) e o tecido adiposo marrom (TAM) (WU et al., 2013).

Por muitos anos o TAB foi considerado como um reservatório de energia e como um isolante térmico para os mamíferos. Atualmente, sabe-se que ele é um órgão endócrino dinâmico, que desperta o interesse de pesquisadores do mundo inteiro devido à sua notável capacidade de produzir e de secretar substâncias bioativas que participam da homeostase energética, da regulação do comportamento alimentar, e influenciam a sensibilidade insulínica e as respostas inflamatórias (WU et al., 2012).

Entre as décadas de 50 e de 60, Kennedy propôs a Teoria Lipostática, pois acreditava que o TAB não era apenas um estocador de gordura na forma de triacilglicerol, mas que ele estaria envolvido no controle da fome e da saciedade. A teoria propunha que os ácidos graxos livres em ação conjunta com o hormônio insulina, eram responsáveis pela comunicação entre o tecido adiposo e o hipotálamo (núcleo arqueado e ventromedial), antigamente conhecido como centro da saciedade (Kennedy, 1966). A Teoria Lipostática não estava de todo modo errônea, pois em 1994, Friedman, trabalhando com modelos experimentais de obesidade em camundongos, identificou a leptina, também chamada de proteína *OB* e a partir desta descoberta o conceito do TAB como órgão endócrino foi consolidado (ZHANG et al., 1994). O TAB teria o papel de lipostato que funciona como um sensor dos níveis de lipídios armazenados, transmitindo informações para o circuito neural, no núcleo

arqueado, e assim, ativando populações de neurônios anorexígenos, produtores de pró-opiomelanocortina (POMC) e do transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) e inibindo neurônios orexígenos como o neuropeptídio Y e proteína Agouti-relacionada (AgRP) (HERTZEL et al., 2008). Além da leptina, foram descritos na literatura vários outros peptídeos bioativos que são produzidos pelo TAB (Tabela 1), a maioria atuando como hormônios (HAUNER et al., 2004).

Tabela 1. Biomoléculas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo branco.

Substância	Efeitos biológicos
Leptina	Sinaliza o SNC sobre os estoques corporais de energia.
Adiponectina	Aumenta a sensibilidade à insulina, é anti-inflamatório e atenua a progressão da aterosclerose.
Resistina	Aumenta a resistência à insulina.
TNF-α	Lipolítico, aumenta o consumo energético e reduz a sensibilidade à insulina.
Interleucina 6	Pró-inflamatório, lipolítico, reduz a sensibilidade à insulina.
Adipsina	Ativa a via alternativa de complemento.
ASP	Estimula a síntese de triacilgliceróis no TAB.
Angiotensinogênio	Precursor da angiotensina II, envolvido na regulação da pressão arterial.
PAI-1	Inibe a ativação do plasminogênio, bloqueando a fibrinólise.
Fator Tecidual	Iniciador da cascata de coagulação.
VEGF	Estimula a proliferação vascular (angiogênese) no TAB.
Visfatina	Insulinomimético produzido predominantemente pela gordura visceral.
Monobutirina*	Vasodilatador e indutor de neoformação vascular
TGFβ	Regula uma série de processos no TAB, entre os quais proliferação de pré-adipócitos, diferenciação, desenvolvimento e apoptose de adipócitos.
IGF1	Estimula proliferação e diferenciação de adipócitos.
HGF	Estimula diferenciação e desenvolvimento de adipócitos.
MIF	Imuno-regulador com atuação parácrina no TAB.
LLP#	Enzima estimuladora da hidrólise de TAG de lipoproteínas (quilomícrons e VLDL).
CETP#	Transfere ésteres de colesterol entre lipoproteínas.
Apo-E#	Componente protéico das lipoproteínas, especialmente das VLDL.
Prostaglandinas*	Reguladores de diversos processos celulares, atuam na inflamação, coagulação sangüínea, ovulação e secreção ácida gástrica.
Estrógenos*	Produzido pela ação da aromatase, sendo a principal fonte estrogênica em homens e em mulheres após a menopausa.
Glicocorticóides*	Gerado pela ação da 11-hidroxiesteróide desidrogenase, tipo II, que transforma cortisona em cortisol no TAB.
Apelina	Ações biológicas ainda não muito claras, relacionadas ao controle dos estoques energéticos corporais.

(*) substâncias não protéicas; (#) proteínas sem ação hormonal.

ADAPTADO DE: FONSECA-ALANIZ et al., 2006

O TAB além de produzir uma série de biomoléculas, compreende uma heterogênea diversidade de células, ele é composto por adipócitos maduros, pré-

adipócitos, células endoteliais vasculares, pericitos, fibroblastos, macrófagos e células-tronco mesenquimais, sendo bem vascularizado e inervado. Células derivadas do tecido adiposo – a fração celular do estroma vascular (pré-adipócitos, células-tronco mesenquimais, células progenitoras endoteliais, células imunes T e B, mastócitos e macrófagos) - compartilham com a medula óssea similaridades, como a capacidade de diferenciação, uma rica fonte de células pluripotentes que contribuem para a terapia angiogênica, a reparação e a regeneração de tecidos (TAKAHASHI, 2012).

Anatomicamente, o tecido adiposo se distribui no organismo como tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral, podendo se expandir, envolver órgãos e se infiltrar em estruturas internas, como nas proximidades das vísceras e dos músculos. Essa infiltração adiposa que acompanha o trajeto de vasos sanguíneos denomina-se tecido adiposo perivascular (GUSIK et al., 2007). O tecido adiposo subcutâneo é, principalmente, representado pelos depósitos abaixo da pele nas regiões abdominal, glútea e femoral. O tecido adiposo visceral é aquele tecido depositado no interior ou junto às vísceras, é mais sensível a ação lipolítica devido à presença de maior número de receptores β1 e β2 adrenérgicos na superfície celular (MAJKA et al., 2011). Além disso, o tecido adiposo visceral é menos sensível à ação antilipolítica da insulina, possuindo uma atividade lipolítica mais intensa.

A partir de estudos morfológicos realizados em embriões humanos, porcinos e murinos foi demonstrado que a adipogênese tem início no período pré-natal e a cronologia do aparecimento do tecido adiposo depende da espécie animal e do tipo de tecido adiposo (DESNOYERS & VODOVAR, 1977).

A origem embriológica dos adipócitos ocorreria de duas formas: 1) uma população de células epiteliais começa a armazenar triacilglicerol sob a forma de

pequenas gotículas, que posteriormente, irão se fundir em uma única gota maior; 2) células fusiformes acumulam triacilglicerol em gotículas, mantendo essa configuração durante a vida útil do tecido. A diferenciação do pré- adipócito em adipócito é um processo complexo que envolve a ação da insulina, do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e de diferentes fatores de transcrição, entre eles os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas do tipo y (PPARy), a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP- 1c) e as proteínas ligantes ao amplificador (CCAAT) (FARMER, 2006).

Estudos recentes indicam que a renovação do tecido adiposo em seres humanos possa ocorrer a cada oito ou nove anos. A renovação do tecido deve-se ao balanço entre a geração de novos adipócitos e a morte por apoptose de adipócitos antigos. Pesquisas em ratos, avaliando o ritmo de desaparecimento do ^{14}C da timina incorporada ao TAB, determinaram que a sobrevida média de uma célula adiposa é de 140 dias (SPALDING et al., 2008). A recuperação do tecido adiposo também ocorre após lipectomia ou desnervação. Shi e Bartnerss (2005) atribuem essa recuperação pós-lipectomia ao efeito induzido pela desnervação cirúrgica, que comprometeria o aporte de informação sensorial das células adiposas para o sistema nervoso central, o que levaria a uma resposta compensatória neural onde os pré-adipócitos remanescentes se multiplicam e se diferenciam, recompondo a massa adiposa.

A visão clássica da função do adipócito branco é de reserva energética, que pode ser mobilizada durante o jejum, liberando ácidos graxos livres e glicerol que serão utilizados como fonte de energia em outros órgãos. O adipócito branco maduro armazena triacilglicerol (TAG), composto formado por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos (AGs), em uma única e grande gota lipídica. No tecido unilocular a gota lipídica ocupa de 85 a 90% do citoplasma e empurra o núcleo

e uma fina camada de citosol para a periferia da célula. A coloração deste tecido é dada devido à presença de carotenóides que conferem coloração amarelo claro (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Os lipídios possuem grande capacidade energética e baixa interação com a água em comparação aos carboidratos, fornecendo mais calorias por grama de tecido (9 kcal/g lipídios x 4 kcal/g carboidratos) (BJORNDAL et al., 2011).

Durante o desenvolvimento da célula jovem, múltiplas gotículas de lipídios coalescem para formar uma inclusão lipídica unitária com o amadurecimento celular. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que as hemácias, os fibroblastos e as células do sistema imunológico. Assim, o tamanho do tecido adiposo (volume e diâmetro) pode variar conforme os períodos da homeostase energética. Para o TAB atender às necessidades energéticas dos tecidos periféricos nas diversas situações fisiológicas, os TAG são continuamente hidrolisados. Essa lipólise ocorre em grau variável de acordo com a demanda, liberando os AGs que serão transportados na circulação na forma livre, não esterificados, mas ligados à albumina, onde poderão ser captados e oxidados pelos tecidos (FLIER, 2004).

O conteúdo de TAG armazenados no TAB é dependente do balanço entre sua velocidade de síntese (lipogênese) e sua velocidade de degradação (lipólise). Em períodos de homeostase energética negativo, como durante o jejum ou o exercício físico, a lipólise é estimulada. Em contraste, em períodos de homeostase energética positivo, como por exemplo, após a ingestão alimentar, a lipogênese e o armazenamento de TAG no TAB são estimulados (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo é controlado diretamente pelos ramos simpático e parassimpático do sistema nervoso autônomo. A inervação simpática está relacionada,

principalmente, com as ações catabólicas, como a lipólise mediada pelos receptores β-adrenérgicos. Por outro lado, o sistema nervoso parassimpático controla os efeitos anabólicos sobre os depósitos adiposos, como as captações de glicose e de ácidos graxos estimuladas pela insulina e a atividade da enzima lipase lipoproteica (LLP) (PÉNICAUD et al., 2000).

O controle da lipólise no TAB é bastante complexo e envolve a interação de diversos fatores. A lipólise consiste da hidrólise sequencial da molécula de TAG, formando subsequentemente diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e três ácidos graxos livres, processos estes catalisados respectivamente pelas enzimas lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL), lipase hormônio sensível (LHS) e lipase de monoglicerídeos (MGL). A ATGL é uma enzima limitante, que catalisa o passo inicial da reação, ou seja, a hidrólise do triacilglicerol liberando ácidos graxos para resterificação ou para a circulação sanguínea. As catecolaminas são as ativadoras primárias da mobilização de AG do TAB induzida pelo jejum. A noradrenalina ligando-se aos receptores β- adrenérgicos, os quais são acoplados às proteínas G na membrana plasmática dos adipócitos, transmite o sinal estimulatório à enzima adenilato ciclase, a qual catalisa a conversão de ATP em AMPc (adenosina monofosfato cíclico). O AMPc gerado liga-se 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 o ATGL e a lipase hormônio sensível (LHS), induzindo sua ativação e, subsequentemente, sua translocação do citosol para a gota de gordura, desencadeando a hidrólise dos TAGs estocados. A ATGL inicia a lipólise por remover especificamente o primeiro ácido graxo do triacilglicerol e o diacilclicerol resultante é, então, hidrolisado pela LHS (WATT et al., 2010).

As perilipinas, proteínas que recobrem a superfície da gota de lipídios, têm a função de proteção contra a hidrólise. Porém quando fosforiladas pela PKA durante o estímulo lipolítico são inibidas. 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, sofrem modificação conformacional permitindo assim o acesso da ATGL e da LHS à gota de gordura (DUNCAN et al., 2007).

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

1.2. O TECIDO ADIPOSO MARROM

Acreditava-se que o tecido adiposo marrom era um tecido especial com a função de manutenção da temperatura corporal em períodos críticos, como imediatamente após o nascimento e durante o período de hibernação de alguns animais. Foi considerado por muitos anos sem relevância fisiológica para adultos humanos, contudo, estudos recentes indicam que o TAM está presente e ativo em humanos adultos e recém-nascidos. Os maiores depósitos de TAM estão localizados no pescoço e na região supraclavicular. Depósitos menores estão presentes ao longo da coluna espinal, nas áreas periaórtica e perirrenal (NEDERGAARD et al., 2007). Adipócitos marrons são termogênicos e, portanto, participam ativamente na regulação

da temperatura corporal, produzindo e dissipando calor (CYPESS et al., 2009). O adipócito marrom pode atingir 60 μm de diâmetro, é multilocular sendo muito menor que o adipócito branco. É uma célula caracterizada pela presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, citoplasma relativamente abundante, núcleo esférico e ligeiramente excêntrico, derivado de uma linhagem celular muscular myf -5 positivo (*myf-5 muscle- like cellular lineage*). Apresenta um grande número de mitocôndrias e utiliza a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor. Esse processo ocorre porque a proteína desacopladora-1 (UCP-1, termogenina), uma proteína da membrana mitocondrial interna do adipócito marrom (Figura 1), atua como um canal de próton que descarrega a energia gerada pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranas das mitocôndrias durante as reações da cadeia de transporte de elétrons, desviando esses prótons do complexo F1F0 (ATP sintase), diminuindo a síntese de ATP e permitindo que a energia estocada na mitocôndria se dissipe na forma de calor (SAELY et al., 2012). Na produção de calor (calorigênese), o sangue ao passar por este tecido, é aquecido e retorna para as demais regiões do corpo. Termoceptores para o frio localizados na pele emitem o sinal para o centro termorregulador hipotalâmico, que envia estímulos eferentes aos adipócitos e estes oxidam rapidamente os ácidos graxos.

A Ca^{++}-ATPase localizada no retículo sarcoplasmático do músculo esquelético, a SERCA, seria a principal via termogênica, não relacionada ao tremor muscular neste tecido. A SERCA também ocorre no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias do TAM, mas não ocorre no TAB. A SERCA teria um papel importante na termogênese do TAM juntamente com a UCP-1. A função termogênica do TAM e a sua diferenciação são induzidas, em condições fisiológicas, pelo aumento da estimulação simpática, como ocorre durante a exposição ao frio e a ingestão de dieta

hipercalórica, promovendo resistência ao frio e ganho de peso corporal, respectivamente. A desnervação simpática do TAM provoca atrofia do tecido, redução da capacidade termogênica e modificação na distribuição de lipídios intracelulares. O TAM apresenta grande quantidade de lipídios armazenados, porém, ao contrário do TAB, esta reserva de lipídios é utilizada pelo próprio TAM (DE MEIS, 2003).

Os hormônios da tireóide agem sobre o TAM controlando a expressão do gene da UCP-1 e estimulando a diferenciação de pré-adipócitos marrons em adipócitos (BROETTO & BRITO, 2012). A exposição do animal ao frio aumenta a atividade da enzima 5'-desiodase tipo II que catalisa a conversão da tiroxina (T4) em triiodotironina (T3) no TAM (SILVA, 2006).

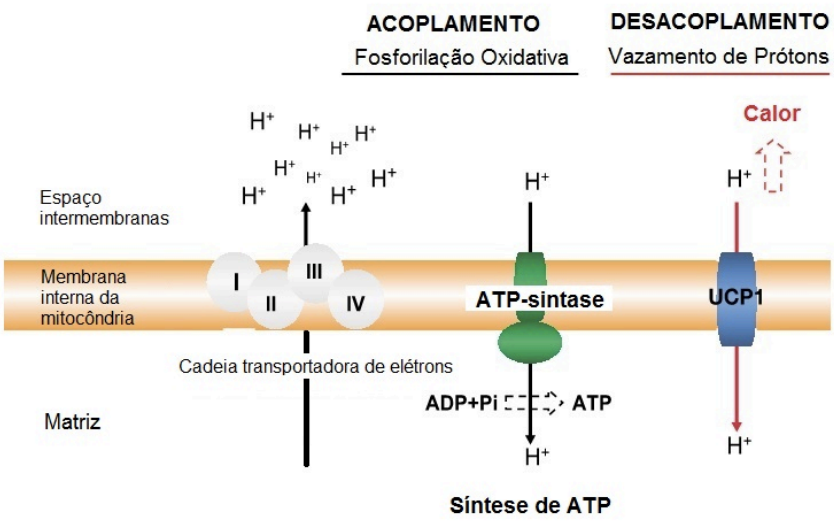


Figura 1: Localização da UCP1 e cadeia respiratória.

ADAPTADO DE: BRONDANI et al. (2012)

1.3. O TECIDO ADIPOSO BEGE

O tecido adiposo bege é um distinto tipo de células adiposas encontradas tanto em roedores quanto em humanos. Recentes descobertas mostraram que existem dois tipos de células adiposas termogênicas, o TAM e o tecido adiposo bege (TABG). Este novo tipo de tecido adiposo pode emergir de depósitos de TAB subcutâneo quando estimulado pelo frio, via estimulação simpática, catecolaminas, tiazolidinedionas, via aumento de AMP cíclico intracelular, passando a agir como um tecido termogênico, expressando níveis elevados de UCP1 positivo e com aparência multilocular (BOSTROM et al., 2012). Células beges emergem de TAB, porém, com uma linhagem totalmente diferente do clássico TAM, que possui origem muscular myf-5 positivo, sugerindo assim, um novo tipo de célula (Figura 2), (WU et al., 2012). Tanto o TAM quanto o TABG possuem o papel de aumentar o gasto energético do organismo.

O TABG possui baixos níveis basais de UCP1, porém, quando alguns depósitos subcutâneos ou viscerais de TAB são estimulados, como, por exemplo, via AMP cíclico, o TABG aumenta a expressão da UCP1 e passa a produzir calor em níveis similares ao TAM. O hormônio polipeptídico irisina, secretado pelo tecido muscular durante exercício físico, também exerce efeito estimulatório sobre alguns depósitos de TAB subcutâneo que passam a expressar níveis elevados de UCP1 e aumentam a dissipação de energia. Esse novo tipo de adipócito parece ser relevante para o tratamento de doenças como a obesidade e diabetes, servindo como alvo para a modificação do fenótipo termogênico do TAB. Como o TABG tem a capacidade de estocar energia e quando estimulado realiza termogênese, ativar a mudança do

fenótipo pode ser um caminho para o tratamento de doenças associadas ao sobrepeso (WU et al., 2013).

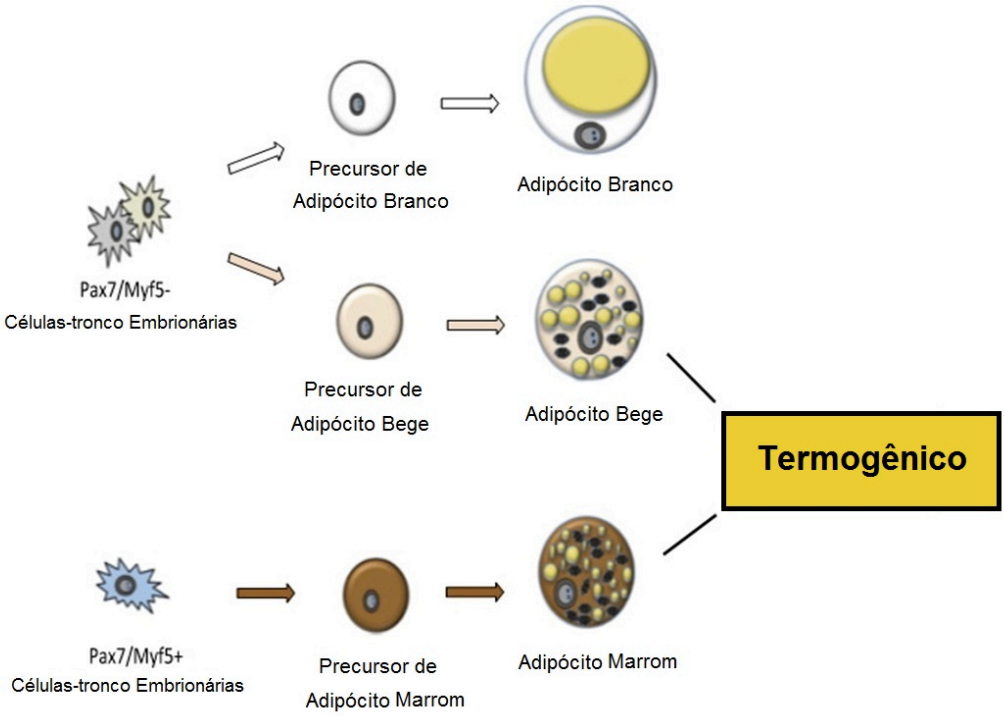


Figura 2: Origens das células adiposas. Precursor do tecido adiposo marrom, branco e bege.

ADAPTADO DE: WU et al. (2013)

1.4. A VIA GLICERONEOGÊNICA

Independente da origem dos AGs, o fornecimento de glicerol-3- fosfato (G3P) é essencial para o funcionamento adequado do TAB e a formação de TAG. A via clássica de obtenção de G3P pelo TAB é a sua síntese a partir de carbonos da glicose, pela conversão de diidroxiacetona fosfato, um intermediário da via glicolítica, à G3P, uma reação catalisada pela enzima G3P desidrogenase. Além desta via, o TAB possui duas outras formas de obtenção de G3P: a) pela fosforilação direta do glicerol pela glicerocinase (GK); b) pela via gliceroneogênica, que consiste na formação de G3P 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 G3P por uma reversão parcial da via glicolítica (Figura 3).

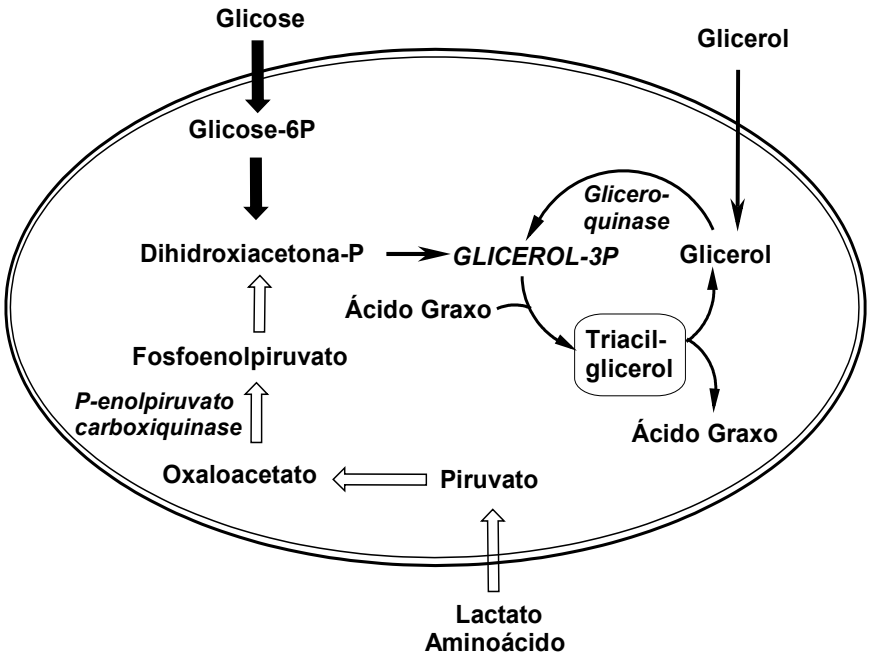


Figura 3: Fontes de glicerol-3-fosfato nos adipócitos branco e marrom.

ADAPTADO DE: HANSON & RESHEF (2004)

Para a produção de energia os tecidos utilizam, preferencialmente, a glicose e os ácidos graxos livres. A lipólise é estimulada em períodos como o jejum, quando há balanço energético negativo para liberar os ácidos graxos livres (AGL) e o glicerol, que serão utilizados como fontes de energia pelo músculo esquelético e cardíaco, fígado, entre outros tecidos. Após a ingestão alimentar, a lipogênese é estimulada e o armazenamento de energia na forma de TAG ocorre no TAB. Assim, o conteúdo de TAG no TAB depende do balanço entre a velocidade de mobilização, lipólise, e a velocidade de síntese, lipogênese.

A via gliceroneogênica é a síntese *de novo* de glicerol, ocorre tanto em mamíferos quanto em outros vertebrados e em invertebrados, sendo considerada uma versão abreviada da gliconeogênese. Ela é uma resposta frente à necessidade de reesterificar ácido graxo para manter o ciclo triacilglicerol/ácido graxo (HANSON & RESHEF, 2004). O excesso de AGL diminui a capacidade de captação de glicose pelos tecidos e o seu metabolismo no músculo esquelético, como resultado, ocorre resistência à insulina e diabetes melitus tipo 2 (ANDERWALD & RODEN, 2004). A gliceroneogênese participaria da reesterificação de parte desses AGL em TAG. Em humanos cerca de 60% do total de AGL formados pela lipólise são reesterificados, sendo que a maior parte deste processo ocorre no TAB (JENSEN et al., 2001).

Os primeiros relatos da existência desta via foram obtidos por Ballard e colaboradores (1967) no TAB. Posteriormente, Reshef e colaboradores (1970) demonstraram no TAB, que em situações catabólicas como jejum e diabetes, ocorre um aumento significativo da síntese de glicerol-3-fosfato, bem como um aumento na atividade da enzima chave da via gliceroneogênica, a fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólica (PEPCKc). Hanson e colaboradores (2004) sugeriram que o aumento da gliceroneogênese no jejum e no diabetes seria uma tentativa do TAB inibir a liberação

excessiva de ácidos graxos para a circulação, evitando assim um aumento na produção hepática de corpos cetônicos e cetoaciconcentração. Reshef, Hanson e Ballard cunharam o termo gliceroneogênese para descrever a conversão de lactato, de piruvato e de aminoácidos glicogênicos em glicerol.

Os estudos sobre a via gliceroneogênica começaram no inicio dos anos de 1960 com a descoberta da PEPCKc. Estudos subsequentes revelaram que a concentração e a atividade desta enzima no tecido adiposo são similares àquelas do fígado, porém o tecido adiposo não é gliconeogênico devido à falta de duas enzimas terminais desta via (BEALE et al., 2002).

A gliceroneogênese foi primeiramente descrita no TAB, mas foi demonstrado que ela também ocorre no fígado de ratos e de humanos e no TAM (BOTION et al., 1995; BRITO et al., 1999; KALHAN et al., 2001).

No TAM a gliceroneogênese controla a liberação de AGs para a mitocôndria, regulando sua resterificação. Sabe-se que os AGs induzem a transcrição do gene da UCP 1 (proteína desacopladora 1) no TAM (LOWELL & SPIEGELMAN, 2000). No TAM a atividade da PEPCKc é aumentada pela noradrenalina, assim, a atividade da gliceroneogênese no TAM controlaria o ritmo de liberação de AGs para a mitocôndria, participando, desta forma, do controle da produção de calor por este tecido (HAHN & KIRBY, 1974; BRITO et al., 1999).

A manutenção da reserva intracelular de triacilglicerol é importante para a homeostase dos TAB e TAM. No TAB, a produção contínua de glicerol-3-fosfato (G3P) é fundamental para que o tecido mantenha ou reponha os seus estoques de TAG. No TAM, os AGs produzidos pela hidrólise dos TAG endógenos são tanto substratos como mensageiros para ativação do processo de geração de calor.

Além disso, parte dos AGs mobilizados do tecido adiposo é encaminhada para o fígado onde participa na formação de TAG. Esse TAG será incorporado em VLDL e secretado para a circulação. Dentre os tecidos que utilizarão os AGs incorporados em TAG de VLDL, encontra-se o próprio tecido adiposo. Portanto além da reciclagem intracelular de AGs existe ainda uma reciclagem sistêmica de AGs.

Diversos fatores controlam a atividade gliceroneogênica além do jejum e da diabetes. Em ratos alimentados com uma dieta rica em proteínas (HP), pobre em carboidratos, a gliceroneogênese é ativada no TAB e no fígado. O aumento da capacidade gliceroneogênica seria uma estratégia para garantir o suprimento de G3P necessário para o armazenamento de TAG e resterificação dos AGs provenientes da dieta (BRITO et al., 2001). No TAM a administração da dieta HP resulta em diminuição da atividade termogênica, redução do peso do tecido e da atividade da citocromo oxidase. Segundo Brito e colaboradores (2001) a preservação da gordura corporal nos animais HP estaria relacionada à redução da capacidade termogênica do TAM.

Ao contrário, em ratos alimentados com a dieta de cafeteria a atividade da GK aumenta marcadamente no TAB e a produção de G3P pela fosforilação direta do glicerol é ativada por esta dieta. Nesses animais ocorre redução da atividade da PEPCKc e da síntese de TAG a partir de piruvato (CHAVES, 2008).

Recentemente, estudos demonstraram que a redução da mobilização de AGs produzida por tiazolidinedionas (TZD), drogas usadas no tratamento do diabetes, é devida principalmente à indução da transcrição do gene da PEPCKc no TAB, com consequente aumento da gliceroneogênese e da esterificação de AGs (Figura 4). Tais experimentos com animais geneticamente modificados ou que receberam TZD vieram comprovar a importância da gliceroneogênese e renovaram o interesse pelo

esclarecimento de seu papel fisiológico (TORDJMAN et al., 2003).

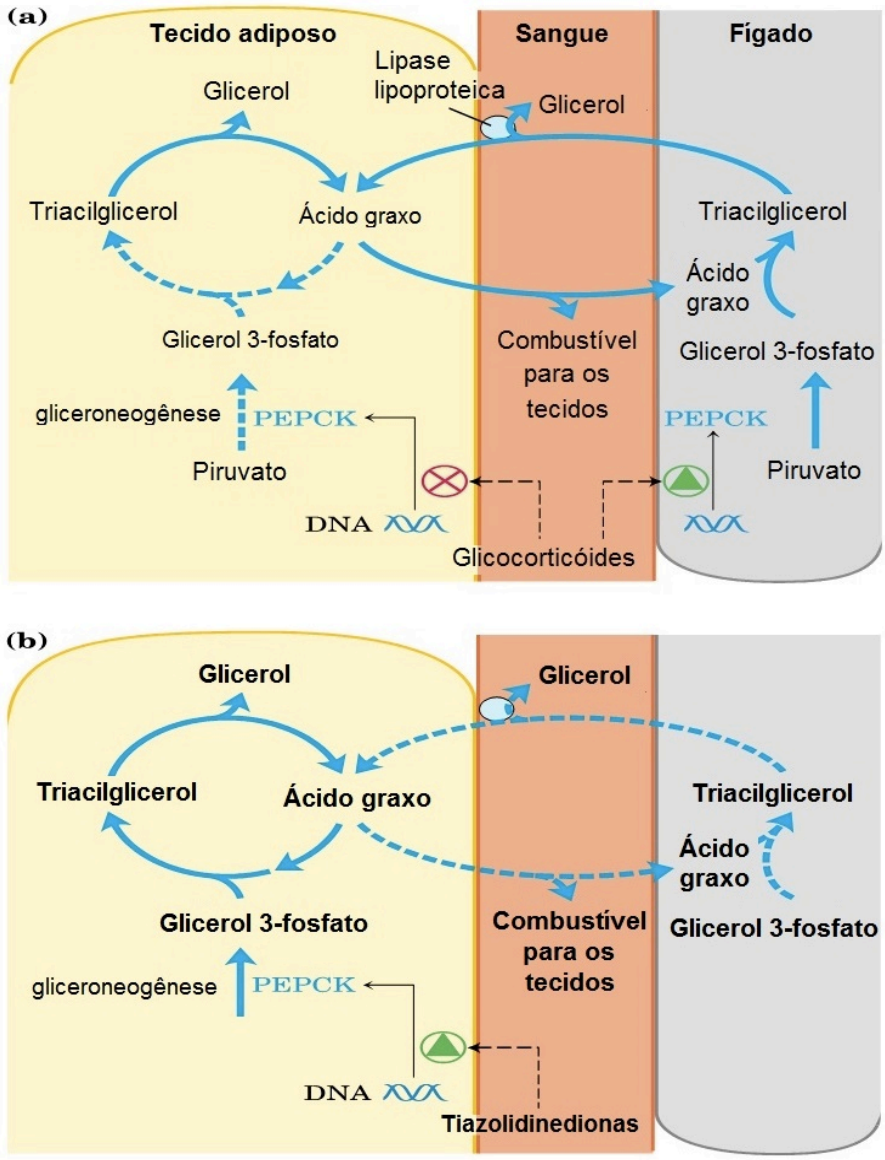


Figura 4: Regulação da Via Gliceroneogênica: a) regulação por hormônios glicocorticóides. b) regulação por drogas Tiazolidinedionas.

ADAPTADO DE: NELSON & COX (2011)

O jejum promove tanto a gliconeogênese quanto a gliceroneogênese, a expressão do gene da PEPCKc é induzida pelos hormônios glucagon e adrenalina e inibida pela insulina (HANSON et al, 1997). Glicocorticóides também afetam a

transcrição do gene, porém de forma diferente, eles induzem a transcrição no fígado e nos rins e inibem no TAB (NECHUSHTAN et al, 1987). Os glicocorticóides induzem a atividade gliceroneogênica no fígado, mas inibem no TAB. A gliceroneogênese no TAM é controlada por fatores hormonais e metabólicos, a insulina tem uma ação inibitória e a transcrição gênica da PEPCKc é estimulada pela adrenalina.

1.5. STANNIOCALCINAS (STCs)

A stanniocalcina (STC), também chamada de hipocalcina ou teleocalcina, é um hormônio glicoproteico originalmente encontrado em peixes teleósteos e pode ser considerado o primeiro hormônio anti-hipercalcêmico dos vertebrados (WAGNER et al., 1986). Nesses animais as STCs são secretadas por um par de pequenas glândulas endócrinas, arredondadas ou ovaladas de coloração creme, associadas anatomicamente ao mesonefro, chamadas Corpúsculos de *Stannius* (CS), que geralmente estão localizadas na superfície ventral dos rins e envoltos por tecido conjuntivo. Os Corpúsculos de *Stannius* foram descobertos em 1839, por Hermann Friedrich Stannius - anatomista, entomologista e fisiologista alemão que na época, acreditou que se tratavam das glândulas adrenais dos peixes (Figura 5). Essa idéia foi defendida até o século XX, quando Chester-Jones e colaboradores (1965) e Ogawa (1967) demonstraram, através de estudos de microscopia eletrônica, que as células dos Corpúsculos de *Stannius* possuíam as características citoplasmáticas de células secretoras de hormônios polipeptídicos, no entanto, não apresentavam qualquer atividade esteroidogênica. Baseado nessas características, os Corpúsculos de *Stannius* foram considerados como glândulas exclusivas de peixes.

A STC possui funções semelhantes à calcitonina (WAGNER et al., 1994) e protege os peixes de episódio hipercalcêmico potencialmente tóxico. É importante salientar o contraste que existe na reserva de cálcio entre as classes de vertebrados. Enquanto que os vertebrados superiores dependem do reservatório de cálcio encontrado nos ossos, os peixes dependem do cálcio presente no ambiente para regular os níveis plasmáticos desse íon (WAGNER et al., 1994). Desde o início da vida, os riscos causados pelas flutuações nas concentrações de cálcio ambiental são frequentes para os peixes. Animais vivíparos têm seu desenvolvimento embrionário dentro do corpo materno que, por sua vez, possui as concentrações do íon cálcio em uma faixa homeostática restrita. Entretanto, desde a fase embrionária os peixes controlam a captação de cálcio do meio externo, pois nos diferentes ambientes as concentrações do íon cálcio apresentam variações que podem chegar a 1000 vezes. Este hormônio restabelece a normocalcemia por meio de efeitos regulatórios: inibindo a absorção de cálcio, através do epitélio intestinal, e a captação de cálcio ambiental pelas brânquias e estimulando a reabsorção renal de fosfato, que tem a função de quelar o excesso de Ca^{+2} (LU et al., 1994; VARGHESE et al., 1998; YEUNG et al., 2012). A causa primária de estimulação da secreção da STC pelo CS é o aumento do cálcio extracelular acima dos níveis fisiológicos. Além do aumento de secreção hormonal ainda há o aumento dos níveis de mRNA da STC (YEUNG et al., 2012). Os peixes possuem receptores sensíveis ao cálcio que desencadeiam os sinais para a resposta fisiológica às flutuações nas concentrações desse íon (RADMAN et al, 2002). Estudos recentes propõem que as STCs também teriam um papel regulador sobre a concentração de outros íons, além do Ca^{+2}, como o Na^{+} e o Cl^{-}(YEUNG et al., 2012).

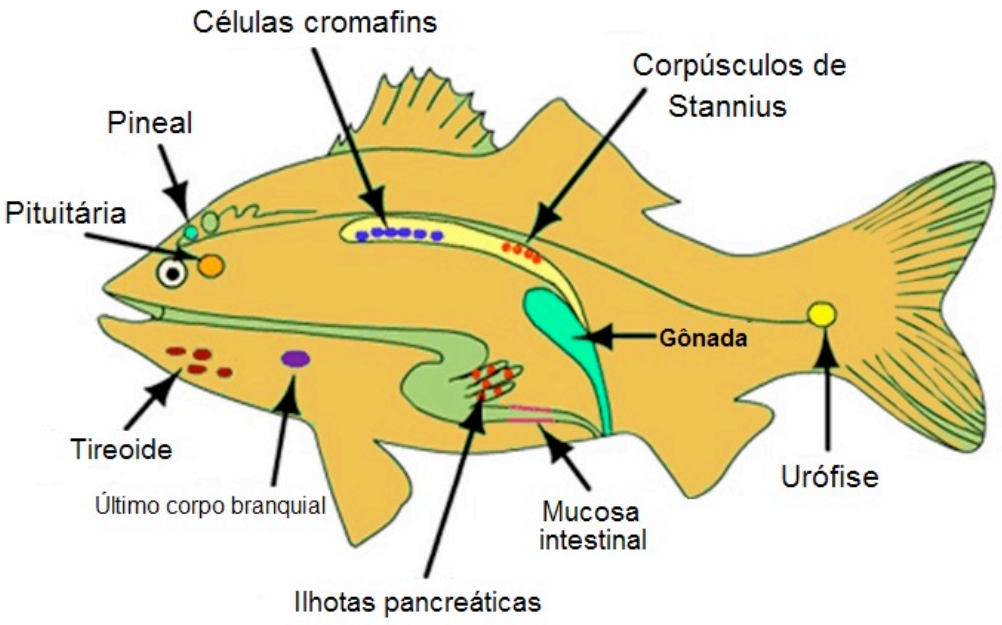


Figura 5: Representação da localização do Corpúsculo de Stannius em peixes

Adaptado de: www.vet.ohio-state.edu

Nos mamíferos não se conhece nenhuma estrutura que possa ser comparada ao CS, assim, acreditava-se que a presença e a função da STC tivessem se perdido durante a evolução. Porém, existem exemplos, entre as diversas classes de vertebrados, que demonstram que nem sempre os hormônios são secretados por glândulas endócrinas específicas. Um estudo imunocitoquímico, utilizando anticorpos de STC de salmão, encontrou, no rim humano, proteínas semelhantes à STC (WAGNER, et al., 1995). Como nos peixes o CS é originado embriologicamente dos néfrons, o tecido renal foi o ponto de partida para a busca de genes ortólogos à STC em humanos (WAGNER et al., 1995; DIMATTIA et al., 1998). No mesmo ano, foi clonado o cDNA de STC com alta homologia com o hormônio dos peixes (CHANG, et al., 1995) e, enquanto que nos peixes essa proteína era sintetizada em um órgão

específico, em tecidos humanos diversos estudos constataram que a STC estava amplamente expressa, sendo o mRNA desse peptídeo expresso nos ovários, nos rins, no pulmão, no fígado, na próstata, no coração, na tireóide e no músculo esquelético (CHANG et al., 1995; RADMAN et al., 2002). Entretanto, o nível de STC nestes órgãos é cerca de 100 vezes menor do que no CS. Em peixes, ainda é desconhecida uma ação parácrina das STCs, porém elas são expressas em testículos, rins e ovários (SERLACHIUS, 2007).

A comprovação da existência do cDNA de STC em diferentes tecidos de camundongos, demonstrou que a STC teria um papel parácrino/autócrino ao contrário daquela função endócrina clássica encontrada nos peixes (CHANG et al., 1996). Baseado no padrão de expressão da STC humana sugere-se que ela atue como um mediador local. Algumas funções dos peixes são mantidas, tal como, o papel sobre o metabolismo mineral com as funções de transporte iônico nos rins e no intestino. Além disso, quando o hormônio humano é administrado em peixes há manutenção da funcionalidade indicando que os domínios dos receptores são bem conservados evolutivamente (DE NIU et al., 2000; VARGHESE et al., 1998).

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

A identificação das células-alvo da STC ainda é difícil pela falta de informações acerca do receptor. Propõe-se que o sistema de sinalização do receptor de STC seja acoplado a proteína G, pois uma ativação da via AMPc /PKA foi constatada em células do túbulo proximal renal tratadas com STC (LU et al., 1994; YEUNG et al., 2012).

Na maioria dos peixes e em todos os mamíferos, a STC1 (posteriormente houve a descoberta de um homólogo das proteínas tanto de peixe quanto de mamíferos que se denominou STC2) é uma proteína glicosilada homodimérica com aproximadamente 50 kDa. Ela é sintetizada como um pré-pró-hormônio, em que a sequência madura tem em média 250 aminoácidos (WAGNER et al., 1994).

Dois anos após a clonagem do cDNA da STC humana, diferentes grupos encontraram a partir de pesquisas *"in silico",*utilizando o programa BLASTn do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), uma proteína que chamaram primeiramente de proteína relacionada a STC. Posteriormente, a STC de peixes e a primeira STC humana clonada foram denominadas de STC1 e a segunda proteína homologa às duas primeiras foi chamada de STC2. Uma análise da expressão da proteína da STC2 em diversos tecidos de humanos e camundongos mostrou o mesmo padrão de expressão variado da STC1 (CHANG & REDDEL, 1998; DIMATTIA et al., 1998; ISHIBASHI et al., 2002). Apesar da STC2 mostrar apenas 30% de identidade na sequência de aminoácidos da STC1 humana, os limites íntrons e éxons, os resíduos de cisteína e os sítios de glicosilação das moléculas permaneceram conservados entre essas duas proteínas. Estudos sobre a estrutura genômica e a filogenia dessas proteínas mostram que elas podem ser derivadas de um gene ancestral comum. Em 2005, Luo e colaboradores também clonaram a STC2 de peixes. O RNAm da STC2 de peixes e de mamíferos, assim como a STC1, também é

expresso em diversos tecidos de peixes (WAGNER & DIMATTIA, 2006). Em mamíferos, tecidos como o pâncreas, o baço, os rins e o músculo esquelético possuem uma marcante expressão do RNAm da STC2. Em situações fisiológicas, ainda não existem evidências de que essa proteína seja encontrada no plasma, tanto de peixes quanto de mamíferos.

1.5.1. Funções Biológicas da STC1 e STC2 em mamíferos

Os primeiros estudos que investigaram a funcionalidade dos hormônios STC1 e STC2 em mamíferos utilizaram ratos transgênicos que super expressavam ou eram *knockout* (animais que perdem a função de determinado gene) para o gene das STCs. Todos os animais que super expressavam os genes das STCs tinham seu crescimento, desenvolvimento muscular e ósseo prejudicados. Os animais *knockout* para STC1 não mostram alterações no fenótipo e aqueles que não expressavam a proteína STC2 mantinham os efeitos inibitórios do crescimento vistos na super expressão dessa molécula (FILVAROFF et al., 2002).

Além de efeitos sobre o crescimento e o desenvolvimento dos organismos ainda existem evidências da importância das STC1 na regulação da homeostase do cálcio e do fosfato em mamíferos. Zhang e colaboradores (2000) constataram que a STC1 aumenta a captação celular de fosfato inorgânico. Os autores também demonstraram que a STC1 diminuiu o dano neuronal causado pelo influxo de cálcio que medeia à toxicidade durante um processo isquêmico em ratos. A idéia de uma relação funcional entre a STC1 e a regulação intracelular de cálcio é fortalecida pela ação inibitória desse hormônio na movimentação transmembrana deste íon via canais de cálcio do tipo lento nos cardiomiócitos (ZHANG et al., 2000).

Todos esses dados sugerem o papel importante da STC1 na homeostase do cálcio e no equilíbrio osmótico em mamíferos. Em contraste, pouco se sabe sobre o papel da STC2 no controle do cálcio e do fosfato em mamíferos. Alguns autores postulam que talvez os dois hormônios tenham funções biológicas complementares (ISHIBASHI & IMAI, 2002). A STC1 possui ainda funções sobre implantação e desenvolvimento do embrião, além de participar da produção de hormônios esteróides nas células tecais de ovários de camundongos (VARGHESE et al., 1998).

Muitas funções, principalmente do hormônio STC1, já foram relatadas, atualmente os tópicos de maior estudo são o envolvimento desses hormônios nos processos inflamatórios e carcinogênicos (ISHIBASHI & IMAI, 2002). Diversas pesquisas na área da oncologia correlacionaram altos níveis de expressão da STC1 e da STC2 em diferentes tipos de câncer a um prognóstico ruim. Pacientes com certos tipos de tumores, diferentemente do que ocorre em uma situação fisiológica, apresentam concentrações detectáveis de STC na corrente sanguínea (ISHIBASHI & IMAI, 2002) e a expressão aumentada da STC1 no sangue periférico foi relacionada como um marcador para detectar carcinoma esofágico (SONG et al., 2012).

1.5.2. Evidências do papel das STCs sobre o metabolismo intermediário em mamíferos

Poucos trabalhos na literatura consultada demonstram o papel da STC1 e da STC2 no controle do metabolismo intermediário. Camundongos transgênicos que super expressavam STC1 no músculo esquelético apresentaram mudanças metabólicas importantes. Esses animais apresentaram hiperfagia, perda de peso e

maior consumo de oxigênio. Além disso, houve um aumento na rapidez de depuração da glicose (FILVAROFF et al., 2002). A STC1 é responsável também por um aumento no tamanho das mitocôndrias sem prejudicar a integridade e a função dessas organelas (ELLARD et al., 2007). McCudden e colaboradores (2002) investigaram a ligação da STC1 ao receptor em membranas de hepatócitos e de células renais. Eles demonstraram a ligação do hormônio STC1 na membrana plasmática e na membrana mitocondrial de hepatócitos, sendo que 90% do hormônio estava localizado na matriz mitocondrial destas células. Esses achados sustentam a importância deste polipeptídio no controle do metabolismo mitocondrial, sendo que é a primeira vez que receptores de hormônios peptídicos são verificados na membrana dessa organela celular. Na literatura, diversos trabalhos sugerem evidências da existência de proteínas na superfície celular que têm afinidade pela STC1 e funcionam como receptores para este hormônio. Não é bem compreendido ainda, se a STC1, quando secretada, liga-se a receptores na membrana plasmática e dispara cascatas de sinalização intracelulares ou se ela sofre endocitose e passa então a atuar dentro da célula. A possibilidade de que ambas alternativas possam ocorrer não é descartada. Outra hipótese seria a presença de diferentes receptores que possuam afinidade à STC1 e cada receptor estaria ligado as diferentes respostas fisiológicas do hormônio em acordo com sua multifuncionalidade. Apesar de todas as evidências, até hoje, nenhum trabalho demonstrou experimentalmente qual é ou quais são os receptor (es) de STC1. Em 2002, McCudden e colaboradores observaram, *in situ,* ligação de alta afinidade de STC1-AP (ligada à fosfatase alcalina) na superfície celular de tecidos como rim e fígado. Os autores purificaram mitocôndrias desses dois tecidos e constataram que nesta organela também ocorria uma ligação de alta afinidade de STC1-AP, mais especificamente na membrana interna da mitocôndria e verificaram que a essa ligação

estimulava o metabolismo mitocondrial e a transferência de elétrons. Ellard e colaboradores (2007) demonstraram que a ligação STC1 aos receptores mitocôndrias pode ser desfeita pela adição de ATP. A exposição de frações mitocondriais de hepatócitos e de células musculares à STC1 aumentou o consumo de oxigênio e a concentração de cálcio mitocondrial e diminuiu a razão ADP:O_2, que indica uma produção menos eficiente de ATP. Além disso, a STC1 aumentou a respiração celular em hepatócitos e em células musculares (ELLARD et al., 2007). O aumento no consumo de oxigênio, em conjunto com uma redução dos níveis de ATP, mostra o papel da STC1 na fosforilação oxidativa (ELLARD et al*.,* 2007; MCCUDDEN et al., 2002). Esses trabalhos contribuem para a melhor compreensão acerca do papel metabólico da STC1.

Serlachius e Andersson (2004) observaram aumento na expressão da STC1 em adipócitos durante seu estágio final de maturação. Os autores relacionaram a presença da SCT1 com a resistência dessas células à apoptose e eles sugerem que a STC1 estaria envolvida com a homeostase do tecido adiposo. Além dessas evidências do papel metabólico da STC1 no metabolismo de lipídios, Paciga e colaboradores (2003) identificaram, nas células lúteas ovarianas, especializadas na esteroidogênese, um acúmulo citoplasmático da STC1 e de seus possíveis receptores. A STC1 se localizava especialmente na superfície das gotas lipídicas. Essas gotas são envolvidas por uma camada única de fosfolipídeos cuja composição é bastante diferente da membrana plasmática. Essa hemimembrana é composta por diversas proteínas como as perilipinas, cuja função é controlar a esteroidogênese e/ou o metabolismo de lipídeos, pois sofre a ação da LHS e ATGL. Observou-se que a STC1 se co-localiza com as perilipinas, fator esse que pode também inferir um papel desse hormônio no

metabolismo de lipídios (SERLACHIUS & ANDERSSON, 2004; PACIGA et al., 2005).

Dados referentes a uma possível ação da STC2 sobre o metabolismo intermediário de mamíferos ainda são escassos. O pâncreas é um sítio produtor de STC2 em mamíferos. Moore e colaboradores (1999), utilizando a técnica de imuno-histoquímica, demonstraram que a STC2 se expressa no pâncreas e sugeriram que a localização da STC2 nas células alfa pancreáticas estaria relacionada ao possível papel desse hormônio sobre o metabolismo da glicose em mamíferos. Existem poucos estudos sobre as ações das STCs no metabolismo intermediário de mamíferos, ainda não existem muitas evidências sobre esses hormônios no metabolismo de lipídios, o presente trabalho, se propõe a investigar essa lacuna existente no conhecimento sobre as STCs.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo desta dissertação foi estudar as ações, *in vitro,* da STC1 humana (STC1) e STC2 humana (STC2) sobre a gliceroneogênese no tecido adiposo de *Rattus norvegicus* em animais alimentados e em jejum de 24 ou 48 horas, com o propósito de demonstrar os efeitos metabólicos destes hormônios.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar, no tecido adiposo branco epididimal e no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus*, alimentados (controle) e em 24 e 48 horas de jejum, as ações da STC1 e STC2 humana, nas concentrações de (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a:

a) Formação de $^{14}CO_2$ a partir de [2-^{14}C]-piruvato;

b) Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol e ^{14}C-ácido graxo;

c) Atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólica (PEPCK-c);

Determinar as concentrações séricas do hormônio Leptina e de Glicose em *Rattus norvegicus*, alimentados (controle) e submetidos a 24 e 48 horas de jejum.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 61 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*), pesando aproximadamente 300 ± 50g. Esses animais foram obtidos do CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais em Laboratório) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Após a retirada dos animais do CREAL os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 21°C e ciclo de 12h claro/12h escuro. Os ratos foram mantidos em caixas contendo dois animais por caixa - receberam água e alimento *ad libitum.* Os animais em jejum de 24 e 48 horas foram acomodados em gaiolas individuais, com maior quantidade de maravalha e com água *ad libitum* até o momento da execução de cada procedimento experimental.

Os procedimentos experimentais aos quais os animais foram submetidos obedeceram às normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (nº 23498).

3.2. Procedimentos Experimentais

Em todos os procedimentos experimentais, os animais foram divididos em 3 grupos: animais alimentados com dieta padrão (controle), animais em jejum de 24 horas e animais em jejum de 48 horas. Os ratos foram mortos por decapitação em guilhotina, procedimento realizado sempre no início da manhã e cujo grau de severidade foi sem recuperação. Após a decapitação, o tecido adiposo branco epididimal (TAB) e o tecido adiposo marrom interescapular (TAM) foram rapidamente excisados de todos os animais e, então, esses tecidos foram fatiados sobre placas de Petri umedecidas com ringer (tampão Krebs Ringer Bicarbonato - KRB): NaCl 118mM, KCl 4,8mM, $CaCl_2$ 1,3mM, KH_2PO_4 1,2mM, $MgSO_4$ 1,2mM e $NaHCO_3$ 24,8mM; pH 7,4 gelado.

Antes da realização de todas as técnicas experimentais utilizadas no presente trabalho os tecidos fatiados foram colocados a tubos de polietileno contendo 1mL de KRB com 1% de albumina sérica bovina (BSA) e pH 7,4. Os tecidos foram pesados e aerados com gás carbogênio (O_2:CO_2, 95:5%, v/v) durante 30 segundos para a substituição da fase gasosa. Esses tecidos foram pré-incubados por 15 minutos a 37ºC, sob agitação constante, em banho metabólico tipo *Dubnoff.*

As concentrações das stanniocalcinas humanas (STCs) usadas neste trabalho foram determinadas em estudos anteriores realizados em nosso laboratório e segundo De Niu e colaboradores (2000). Foram utilizadas 3 concentrações de STC1 humana: 0,01ng/mL (STC1-A), 0,1ng/mL (STC1-B) e 10ng/mL (STC1-C) e três concentrações

de STC2 humana: 0,01ng/mL (STC2-A), 0,1ng/mL (STC2-B) e 10ng/mL (STC2-C), ambas diluídas em KRB (*Recombinant Human* STC1 and STC2, HEK 293 *cell line, RayBiotech Inc. USA*).

Após o período de pré-incubação os tecidos provenientes de um mesmo animal (TAB e TAM) foram divididos em grupos. Para o TAB: um grupo ringer, no qual os tecidos foram incubados com KRB sem a presença de nenhum hormônio exógeno; três grupos incubados com a STC1 humana nas concentrações de 0,01ng/mL (STC1-A), 0,1ng/mL (STC1-B) e 10ng/mL (STC1-C), respectivamente e três grupos que foram incubados com a STC2 humana nas concentrações de 0,01ng/mL (STC2-A), 0,1ng/mL (STC2-B) e 10ng/mL (STC2-C), respectivamente. Para o TAM: um grupo ringer, no qual os tecidos foram incubados com KRB sem a presença de nenhum hormônio exógeno; um grupo que foi incubado com a STC1 humana na concentração de 0,1ng/mL (STC1-B) e um grupo que foi incubado com a STC2 humana na concentração de 0,1ng/mL (STC2-B) (APÊNDICE - A). O tempo de incubação escolhido para este trabalho foi baseado nos estudos de Brito e colaboradores (1999) e Brito e colaboradores (2001). Para o TAB foi utilizado o tempo de 60 minutos de incubação em todos os ensaios experimentais e para TAM foi utilizado o tempo de 120 minutos.

3.3. Formação de $^{14}CO_2$ a partir de [2-^{14}C]-piruvato

A formação de $^{14}CO_2$ a partir de 2-^{14}C-piruvato foi realizada segundo método descrito por Torres e colaboradores (2001).

Após pré–incubação, os tecidos foram incubados em vidros com tampa de borracha que continham 1mL de solução KRB 1% BSA, pH 7,4 acrescido de: 0,1 µCi de [2-^{14}C]-ácido pirúvico (*Perkin Elmer* 0,27 GBq/mmol, 7,3 mCi/mmol), 5 mM piruvato, 1% fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), na ausência (grupo ringer) ou presença das concentrações de 0,01; 0,1 e 10ng/mL de STC humana 1 ou 2. Vidros em formato de "J", com um poço que continha uma tira de papel 3MM *Whatman* para a captação do $^{14}CO_2$ resultante da oxidação do 2- ^{14}C-piruvato foram fixados às tampas de borracha e permaneceram dentro do frasco durante o período de incubação sem encostar na solução de incubação.

Posteriormente, a fase gasosa foi substituída por carbogênio (O_2:CO_2, na proporção 95:5% v/v) por 30 segundos e as tampas foram fechadas e vedadas com parafilme. A incubação ocorreu em banho metabólico tipo *Dubnoff* a 37ºC com agitação constante por 120 minutos para o TAM e 60 minutos para o TAB. Após esse período a reação de oxidação foi interrompida com a administração de uma injeção, através da tampa de borracha, de 0, 25mL de TCA 50% no meio de incubação e 0,25mL de NaOH 2M no poço de vidro. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24 horas para que todo o $^{14}CO_2$ formado fosse captado pelo papel 3MM

Após este período, foram retirados os vidros em formato de "J" e o papel 3MM foi inserido em frascos com 2,5mL de líquido de cintilação (Tolueno-*Triton* X-100 (2:1), PPO 0,4%, POPOP 0,01%). A radioatividade foi medida em um contador (LKB-Wallac). Os resultados foram expressos em mmoles de ^{14}C-piruvato incorporados em $^{14}CO_2$.. mg^{-1}. h^{-1}

3.4. Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol e em ^{14}C-ácido graxo

Os experimentos referentes à incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol (gliceroneogênese) e em ^{14}C-ácido graxo foram realizados segundo Botion e colaboradores (1995).

Tecidos provenientes de ratos alimentados com dieta padrão ou em jejum (24 e 48 horas), foram pré-incubados, aerados com carbogênio (O_2:CO_2, na proporção 95:5% v/v) e incubado sem banho metabólico tipo Dubnoff a 37ºC, com agitação constante, por 120 minutos para o TAM e 60 minutos para o TAB com seus respectivos hormônios, STC 1 e 2 em suas respectivas concentrações de 0,01; 0,1 e 10ng/mL. Estes tecidos foram imediatamente colocados em gelo após incubação. Os tecidos foram lavados com solução KRB e secos em papel filtro.

Para extração dos lipídios totais, foi utilizado o método descrito por Folch (1957). Todos os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador tipo *Potter-Elvejhem* com pistilo de teflon, com clorofórmio-metanol 2:1 (v:v) e permaneceram por 24horas em tubos pirex vedados com parafilme em temperatura de 10 °C. Posteriormente, foram filtrados e transferidos para tubos falcon. Foi acrescentada água destilada e foram realizadas 3 centrifugações (centrífuga *MTD III plus*) a 2250 x g por 15 minutos. A fase clorofórmica inferior foi separada e permaneceu em capela para evaporação.

Ao conteúdo de cada tubo, após evaporação da fase clorofórmica, foi acrescentado 1 mL de KOH alcoólico. A seguir, os tubos foram tampados e incubados em banho metabólico tipo *Dubnoff* a 75 ^{0}C por 1 h. Após resfriamento, foram adicionados 2 mL de água destilada e os tubos foram deixados abertos até desaparecer

o odor de álcool. O conteúdo restante desses viais foi vertido em tubos falcon. Em cada falcon, foram adicionados 5mL de éter de petróleo, agitados em vórtex e realizadas 2 centrifugações (centrífuga *MTD III plus*) a 420 xg por 5 minutos. A fase superior foi descartada e à fase inferior restante, foram adicionadas 2 gotas de verde de bromocresol (0,04%) para obter coloração azul, e posteriormente, ácido sulfúrico 6N, para acertar a titulação, até obtermos a coloração amarela. Após, as amostras foram centrifugadas (centrífuga *MTD III plus*) com 5 mL de clorofórmio a 420 x g por 5minutos. Foi utilizado e 1mL da fase superior aquosa para determinação de ^{14}C -glicerol e 1mL da fase inferior para determinaçãodo^{14}C -ácido graxo. Ambos permaneceram em capela para evaporação. Após a evaporação, foi acrescentado o líquido de cintilação (Tolueno-TritonX-100 (2:1), PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade foi estimada através de contador (LKB-Wallac). Os resultados foram expressos em nmol de ^{14}C-piruvato incorporados em g. tecido^{-1} h^{-1}.

3.5 Determinação da atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK [E.C.4.1.1.32])

A determinação da atividade da PEPCK citosólica foi realizada segundo a técnica descrita por Utter & Kurahashi (1955), baseado na reação de troca entre $H^{14}CO_3^-$ e o oxaloacetato.

As amostras de TAM e TAB (cerca de 3g) dos diferentes grupos experimentais previamente pré-incubadas, aeradas com carbogênio e incubados com as diferentes concentrações de STC1 e STC2, por 120 minutos para o TAM e 60 minutos para o TAB, foram homogeneizadas em sacarose 0,25M na proporção de 1:2(v/v), mais 1% de PMSF, com a utilização de homogeneizador tipo *Potter-Elvejhem* com pistilo de

teflon. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos a temperatura de 4ºC. O sobrenadante foi retirado e centrifugado (*Sorvall centrifuge*-RC-5B) a 18.000 x g por 60 minutos a 4ºC. Aproximadamente 100µL de amostra foram reservadas para dosagem de proteínas (quantificadas através de ensaio colorimétrico, com kit comercial para proteínas totais -Labtest). A mistura da reação (450µL) continha tampão Tris-HCl 0,625M, oxaloacetato (OAA) 0,3M, $MnCl_2$ 0,04M, $MgCl_2$ 0,4M, GSH 6,25M, trifosfato de inosina (ITP) 0,02M, $NaHCO_3$ 1M e 0,4µCi de $NaH^{14}CO_3$ (*Perkin Elmer* 1,88 GBq/mmol, 50,8 mCi/mmol). A essa mistura foram adicionados 50µl de amostra e foi realizada a incubação em banho metabólico do tipo *Dubnoff* a 37ºC durante 4 minutos. Para cada grupo experimental foi preparado um branco que continha todos os componentes da mistura (inclusive a amostra), exceto ITP (ativador enzimático).

A reação enzimática foi interrompida com 500µl de ácido tricloroacético (TCA) 5%. As amostras foram imediatamente aeradas com CO_2 durante 5 minutos para remoção do excesso de $H^{14}CO_3$. Após, as amostras foram centrifugadas (centrífuga *MTD III plus*) a 2250 x g por 10 minutos. Foram retirados 300µl do sobrenadante e repassados para os viais contendo 3ml de líquido de cintilação (Tolueno-Triton X-100 (2:1), PPO 0,4% , POPOP 0,01%). A radioatividade foi medida em contador LKB-Wallac.

As contagens obtidas dos brancos eram descontadas das contagens das amostras e os resultados da atividade foram expressos em µmol de $H^{14}CO_3^-$ incorporado em oxaloacetato. mg^{-1} de proteína. min^{-1} de incubação.

3.6. Análises Bioquímicas

Após a decapitação dos animais, o sangue foi coletado em tubos com ativador de coagulação e centrifugado (centrífuga *MTD III plus*) a 420 x g por 10 minutos para separação do soro. As amostras foram congeladas a -20°C até sua utilização.

A glicemia foi quantificada através de ensaio colorimétrico, com kit comercial (Life Biotechnology). Os resultados expressos em mg de glicose por dL de soro.

A dosagem do hormônio leptina foi realizada, através de kit de ELISA, (Millipore Rat Leptin) e os resultados foram expressos em ng de leptina por mL de soro.

3.7. Análise Estatística

O cálculo do número mínimo de animais (n) foi baseado na técnica da atividade da fosfoenolpiruvato carboxicinase citosólica (PEPCKc) , no *Computer Programs for Epedemiologists* (WIN PEPI – versão 9.1), utilizando-se dados de estudo prévio (Brito et al., 2001). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 95%, erro aceitável de 10% e perda esperada de 10%. Assim, chegou-se a um número amostral de 61 animais.

Para testar a homogeneidade dos resultados foi usado teste de Levene e para testar a normalidade, teste de Kolmogorov-Smirnov. Para dados paramétricos, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias, complementado com teste *Post-Hoc* de Bonferroni e os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média. Para dados não paramétricos, foi utilizado teste de Kruskal Wallis, seguido do

teste de comparação múltipla de Dunn e os resultados foram expressos como mediana e intervalo interquartil (10 e 90%). Ambos os testes foram realizados no software SPSS (IBM SPSS Statistics 17). As diferenças foram consideradas significativas quando $P<0,05$.

3.8. Proteção ao Pesquisador

Durante a execução das técnicas constantes no presente trabalho os pesquisadores envolvidos usaram luvas de procedimento cirúrgico e vestimentas adequadas para sua própria proteção. Quando necessário também foram utilizados máscara e óculos de proteção. Além destes cuidados, a preparação das soluções voláteis ocorreu dentro da capela de exaustão. O descarte dos resíduos não-tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum e os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de eliminação.

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

3.9. Tratamento de Resíduos

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

4. RESULTADOS

4.1. Ações da STC1 e da STC2 sobre o tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus*

4.1.1. Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC1 sobre a oxidação de 2 ^{14}C-piruvato em $^{14}CO_2$.

O hormônio STC1 nas concentrações estudadas (A: 0,01ng/mL, B: 0,1ng/mL e C: 10ng/mL) não alterou significativamente a oxidação de [2-^{14}C] piruvato no TAB, em relação à incubação com ringer, tanto no grupo controle (alimentado) quanto nos animais submetidos ao jejum. (Figura 6).

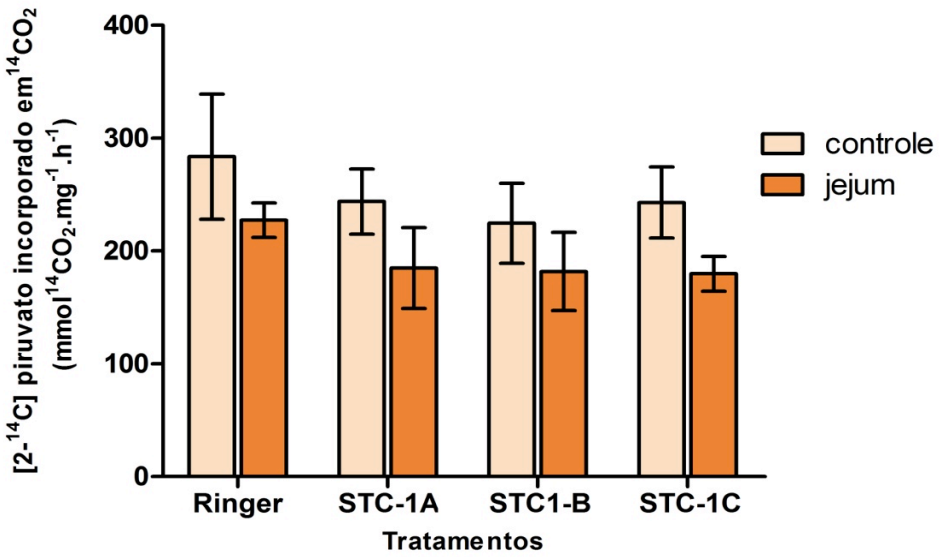


Figura 6. Oxidação de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo branco epididimal (TAB) de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC1 ou na ausência (ringer), (n=7-8). Resultados foram expressos em mmol de $^{14}CO_2$. formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média.

4.1.2. Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC2 sobre a oxidação de 2 ^{14}C-piruvato em $^{14}CO_2$.

Após a incubação na presença de diferentes concentrações do hormônio STC2 (A: 0,01ng/mL, B: 0,1ng/mL e C: 10ng/mL), a oxidação de [2-^{14}C] piruvato pelo TAB diminuiu significativamente (P< 0,05) no grupo jejum 24 horas em relação ao grupo ringer/controle nas concentrações A: 0,01ng/mL e C: 10ng/mL. Nos animais controle (alimentados) a incubação com STC2 (A: 0,01ng/mL, B: 0,1ng/mL e C: 10ng/mL) não alterou significativamente a oxidação de [2-^{14}C] piruvato no TAB. (Figura 7).

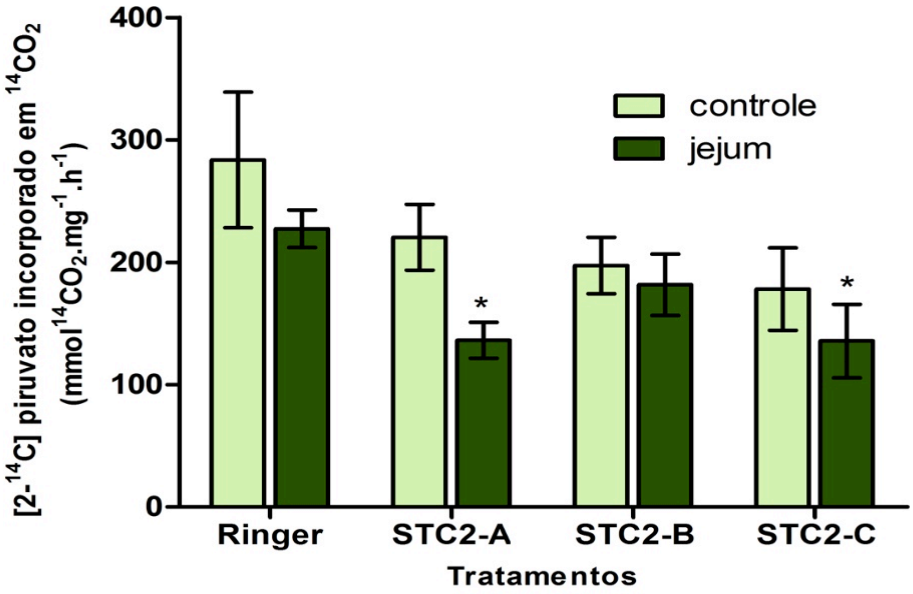


Figura 7. Oxidação de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo branco epididimal (TAB) de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC2 ou na ausência (ringer) (n=7-8). Resultados foram expressos em mmol de $^{14}CO_2$ formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle/ringer (P<0,05).

4.1.3. Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC1 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol

A STC 1 nas concentrações utilizadas (A: 0,01ng/mL, B: 0,1ng/mL e C: 10ng/mL) não alterou significativamente a formação de glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato, tanto no grupo controle (alimentado) quanto nos grupos jejum (24 e 48 horas). O jejum de 24 e 48 horas diminuiu significativamente (P<0,05) a incorporação do ^{14}C do piruvato em glicerol, em relação ao grupo ringer/controle (alimentado). (Figura 8).

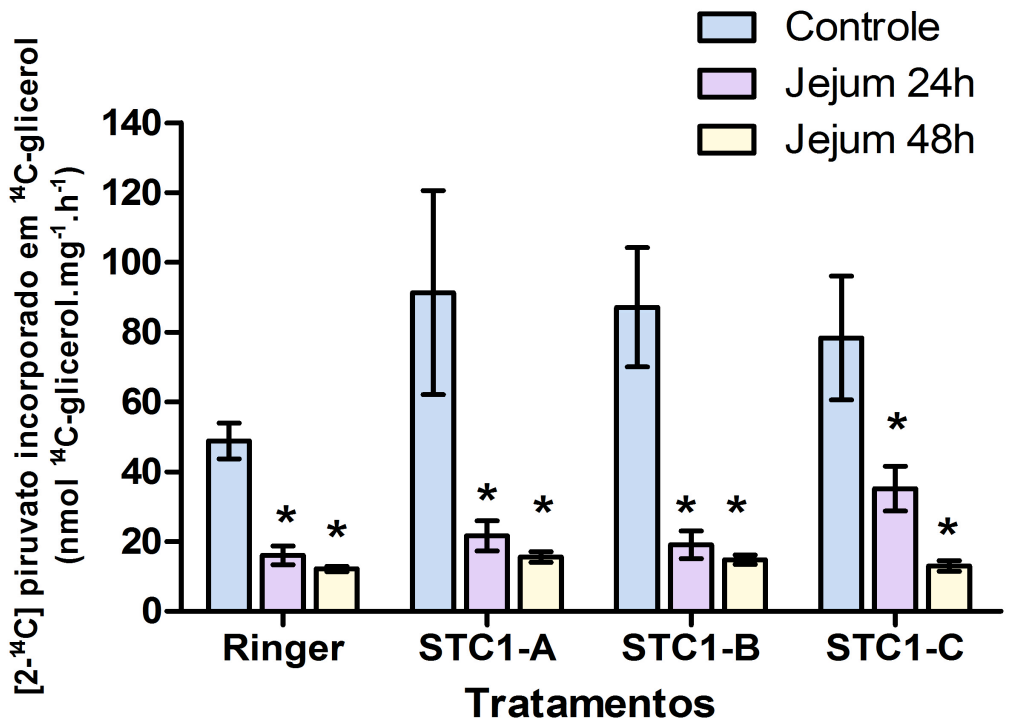


Figura 8. Formação de glicerol a partir [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo branco epididimal (TAB) de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC1 ou na ausência (ringer), (n=6-9). Resultados foram expressos em nmol de ^{14}C-glicerol formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa entre os grupos controle e jejum nos tratamentos com ringer e com as concentrações de STC (P<0,05).

4.1.4. Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC2 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol

No grupo controle (alimentado) o hormônio STC2 nas concentrações A (0,01ng/mL) e B (0,1ng/mL) aumentou significativamente (P<0,05) a formação de glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato no TAB. O jejum de 48 horas diminuiu marcadamente (P<0,05) a incorporação do ^{14}C do piruvato em glicerol em relação ao grupo ringer/controle. Entretanto, no grupo em jejum (24 ou 48 horas) a STC2 não alterou significativamente a formação de glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato no TAB (Figura 9).

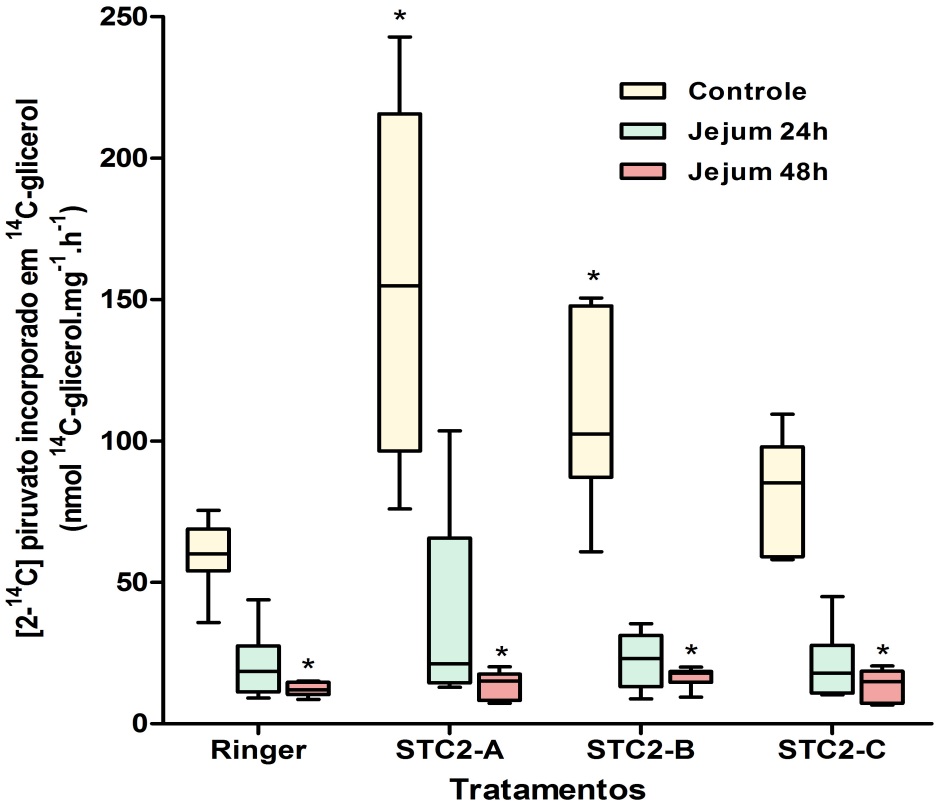


Figura 9. Formação de glicerol a partir de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo branco epididimal (TAB) de *Rattus norvegicus* em animais controle (alimentados) e submetidos a 24 e 48 horas de jejum, na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC2 ou na ausência (ringer), (n=7-9). Resultados foram expressos em nmol de ^{14}C-glicerol formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis de 10 e 90. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle/ringer (P<0,05).

4.1.5. Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC1 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo

Na presença de diferentes concentrações de STC 1 (A: 0,01ng/mL, B: 0,1ng/mL e C: 10ng/mL) a formação de ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato não foi alterada significativamente em relação ao grupo ringer, tanto nos animais controle (alimentados) quanto nos submetidos ao jejum. No TAB incubado com ringer, o jejum de 24 e 48 horas diminuiu significativamente a incorporação do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo, em relação ao grupo controle (alimentado). (Figura 10).

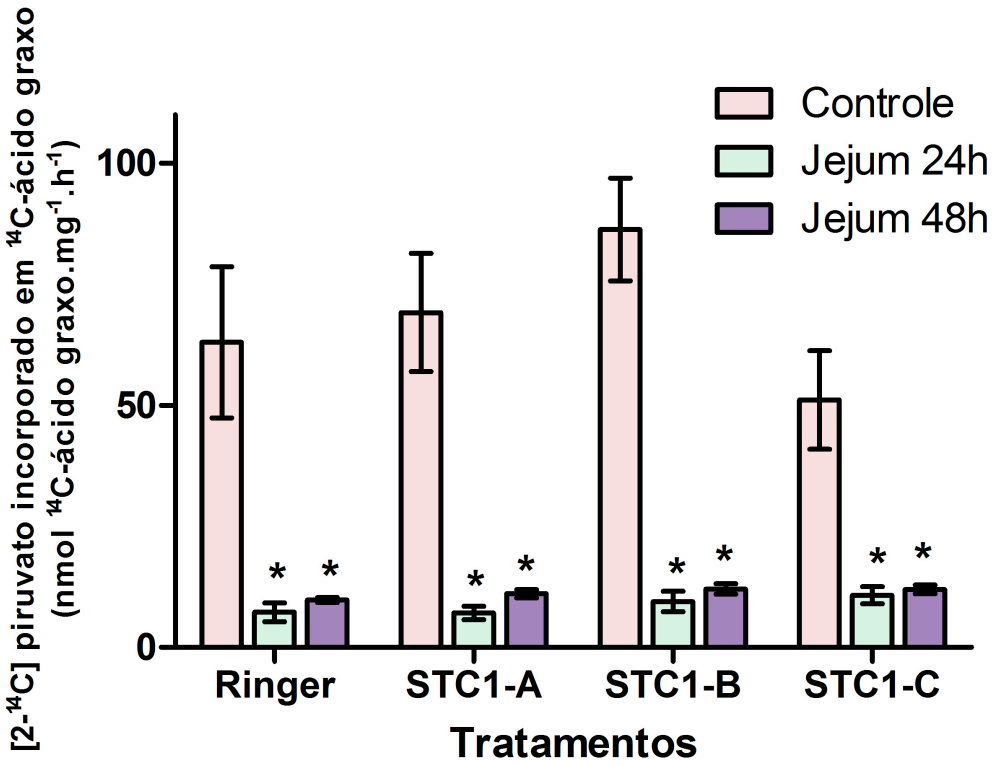


Figura 10. Formação de ácido graxo a partir [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo branco epididimal (TAB) de *Rattus norvegicus* em animais controle (alimentados) e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC1 ou na ausência (ringer), (n=8-11). Resultados foram expressos em nmol de ^{14}C–ácido graxo formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação aos respectivos grupos controle ($P<0,05$).

4.1.6. Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações da STC2 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo

Na presença de diferentes concentrações de STC 2 (A: 0,01ng/mL, B: 0,1ng/mL e C: 10ng/mL) a formação de ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato não foi alterada significativamente em relação ao grupo ringer, tanto nos animais controle (alimentados) quanto nos submetidos ao jejum. No TAB incubado com ringer, o jejum de 24 e 48 horas diminuiu significativamente a incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo, em relação ao grupo controle (alimentado) (Figura 11).

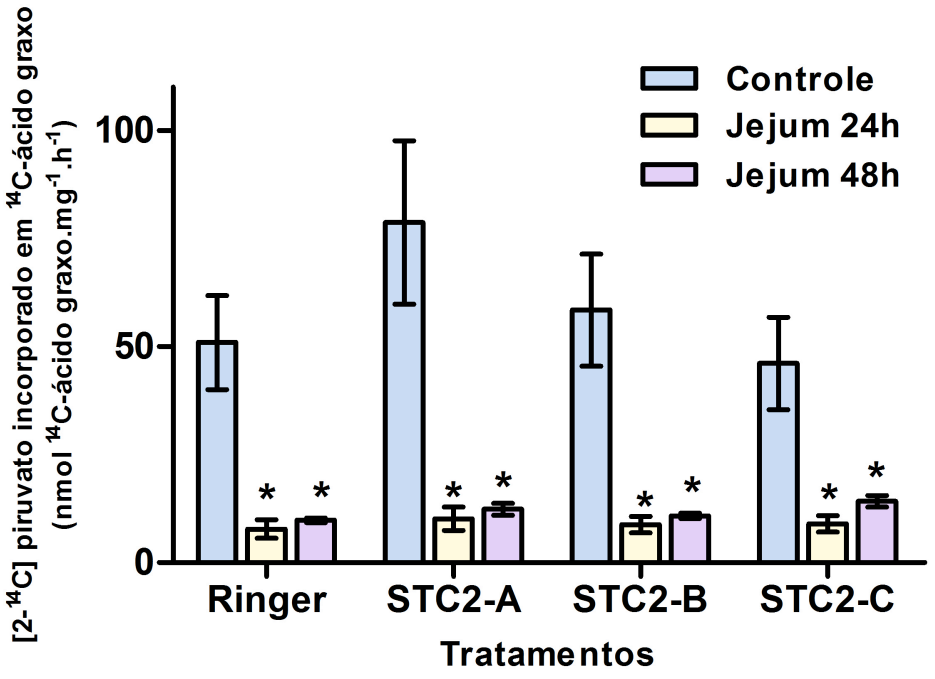


Figura 11. Formação de ácido graxo a partir de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo branco epididimal (TAB) de *Rattus norvegicus* em animais controle (alimentados) e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença de diferentes concentrações (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL) de STC2 ou na ausência (ringer) (n=8-10). Resultados foram expressos em nmol de ^{14}C–ácido graxo formado por mg^{-1}. h^{-1}. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle/ringer ($P<0,05$).

4.1.7. Relação entre formação de glicerol e formação de ácidos graxos nas diferentes concentrações da STC1 em animais alimentados e em jejum de 24 e 48h.

A razão da incorporação do [2-^{14}C] piruvato em glicerol/incorporação do [2-^{14}C] piruvato em ácidos graxos é cerca de 2 vezes maior em ratos em jejum de 24 horas, incubados em presença de STC 1 nas concentrações A= 0,01ng/mL e C=0,10ng/mL, em relação ao respectivo grupo controle (Figura 12).

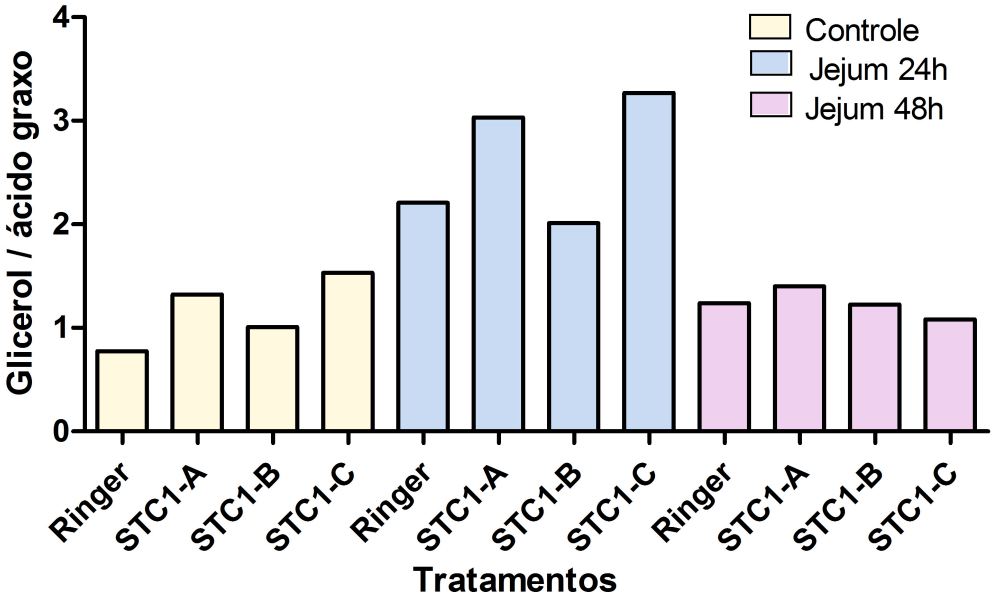


Figura 12. Relação entre a formação de ^{14}C-glicerol e a formação de ^{14}C-ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato [(nmol de glicerol. mg^{-1}.h^{-1}) / (nmol de ácido graxo. mg^{-1}. h^{-1})]. de *Rattus norvegicus* alimentados e em jejum de 24 e 48horas no tecido adiposo branco epididimal (TAB) incubados com diferentes concentrações de STC1(A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL).

4.1.8. Relação entre formação de glicerol e ácidos graxos entre as diferentes concentrações da STC2

A razão da incorporação do [2-^{14}C] piruvato em glicerol/ incorporação do [2-^{14}C] piruvato em ácidos graxos é cerca de 2 e 3 vezes maior no grupo jejum de 24 horas, incubados em presença de STC 2 na concentração A= 0,01ng/mL, quando comparada aquelas dos ratos alimentados (controles) e em jejum de 48h, com a mesma concentração de hormônio, respectivamente (Figura 13).

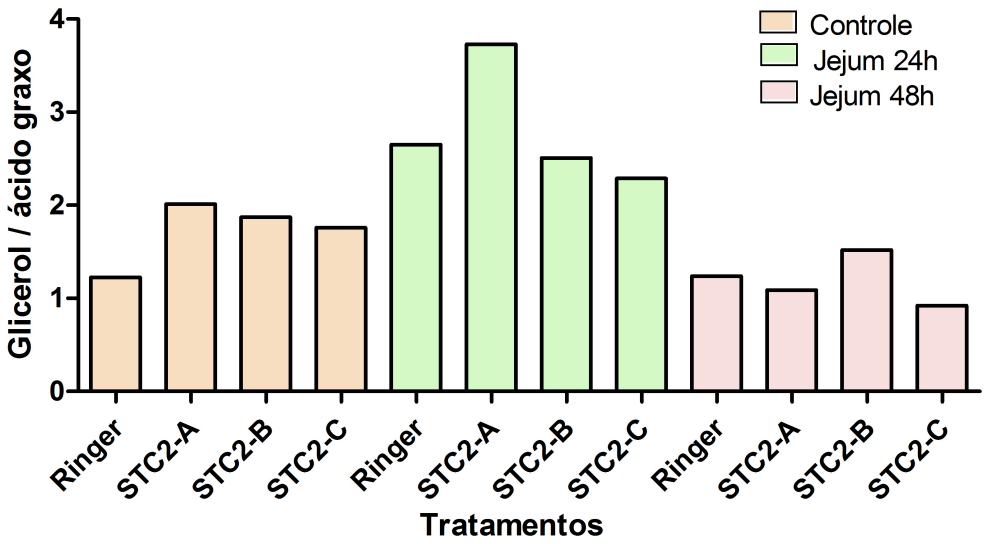


Figura 13. Relação entre a formação de ^{14}C-glicerol e a formação de ^{14}C-ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato [(nmol de glicerol. mg^{-1}.h^{-1}) / (nmol de ácido graxo. mg^{-1}. h^{-1})] de *Rattus norvegicus* alimentados e em jejum de 24 e 48horas no tecido adiposo branco epididimal (TAB) incubados com diferentes concentrações de STC2 (A: 0,01ng/mL; B: 0,1ng/mL; C: 10ng/mL).

4.1.9. Estudo *in vitro* da ação da STC1 e STC2 sobre a atividade da enzima PEPCK através da incorporação de $H^{14}CO_3$ em oxaloacetato

A incubação do TAB de ratos controle (alimentados) em presença de STC 1 e STC 2 na concentração (B= 0,1ng/mL) não alterou significativamente a atividade da enzima PEPCKc (Figura 14).

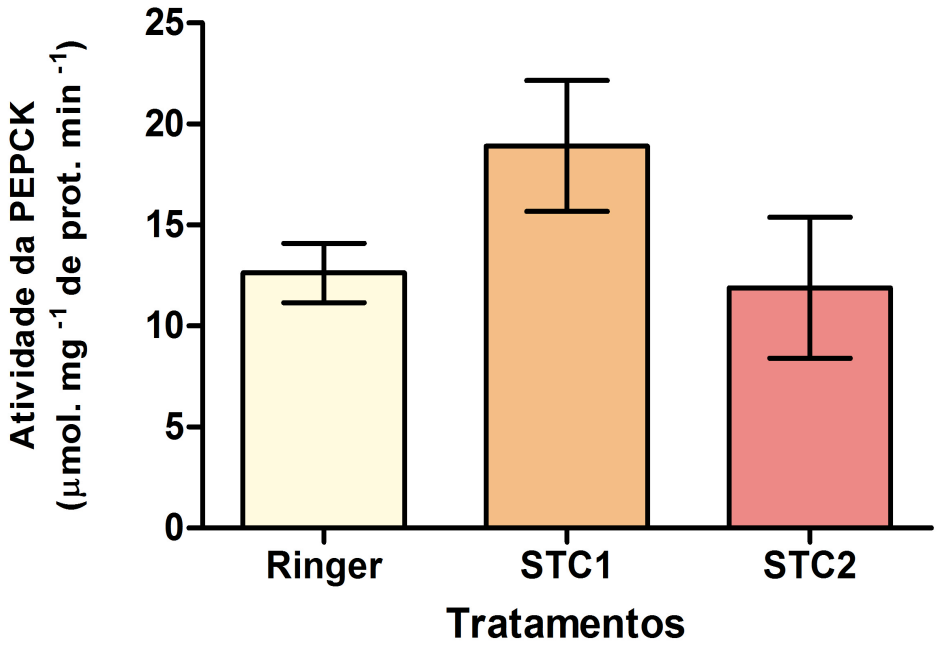


Figura 14. Atividade da enzima PEPCKc no tecido adiposo branco epididimal (TAB) de *Rattus norvegicus* em animais controle (alimentados) na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 e STC2 ou na ausência (ringer) (n=6-10). Resultados foram expressos em µmol de $H^{14}CO_3$ incorporado. mg^{-1} de prot. min^{-1}. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média.

4.2. Ações da STC1 e da STC2 sobre o tecido adiposo marrom interescapular de *Rattus norvegicus*

4.2.1. Estudo *in vitro* da ação da STC1 sobre a oxidação de 2 ^{14}C-piruvato em $^{14}CO_2$

No TAM de ratos controle (alimentados) a oxidação de [2-^{14}C] piruvato na presença da concentração B=0,1ng/mL do hormônio STC1 diminuiu 2,5 vezes (P<0,05) em relação ao TAB incubado com ringer. Contudo, quando o TAM de ratos submetidos ao jejum de 24 horas foi incubado em presença do hormônio STC 1 não foi verificada alteração significativa na oxidação de [2-^{14}C] piruvato em relação à incubação sem hormônio. Nos tecidos incubados com ringer não houve diferença significativa entre os grupos controle e jejum (Figura 15).

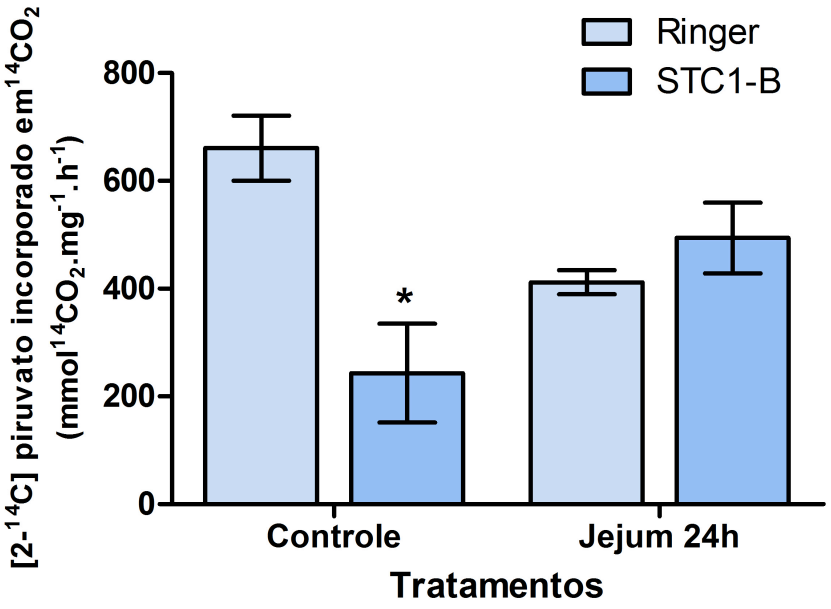


Figura 15. Oxidação de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 ou na ausência (ringer) (n=4-5). Resultados foram expressos em mmol de $^{14}CO_2$ formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle/ringer (P<0,05).

4.2.2. Estudo *in vitro* da ação da STC2 sobre a oxidação de 2 ^{14}C-piruvato em $^{14}CO_2$.

Na (Figura 16) a STC 2 na concentração (B=0,1ng/mL) diminuiu significativamente (P<0,05) a oxidação de [2-^{14}C] piruvato quando comparado ao grupo sem hormônio em ratos controles (alimentados). Contudo, nos animais em jejum, a mesma concentração de STC 2 não alterou significativamente a incorporação do ^{14}C do piruvato em $^{14}CO_2$ em relação ao grupo sem hormônio. A oxidação de [2-^{14}C] piruvato no grupo controle/STC2-B foi significativamente menor em relação ao grupo jejum/STC2-B. Além disso, a oxidação de [2-^{14}C] piruvato no grupo jejum/ringer diminuiu significativamente (P<0,05) em relação ao grupo controle/ringer.

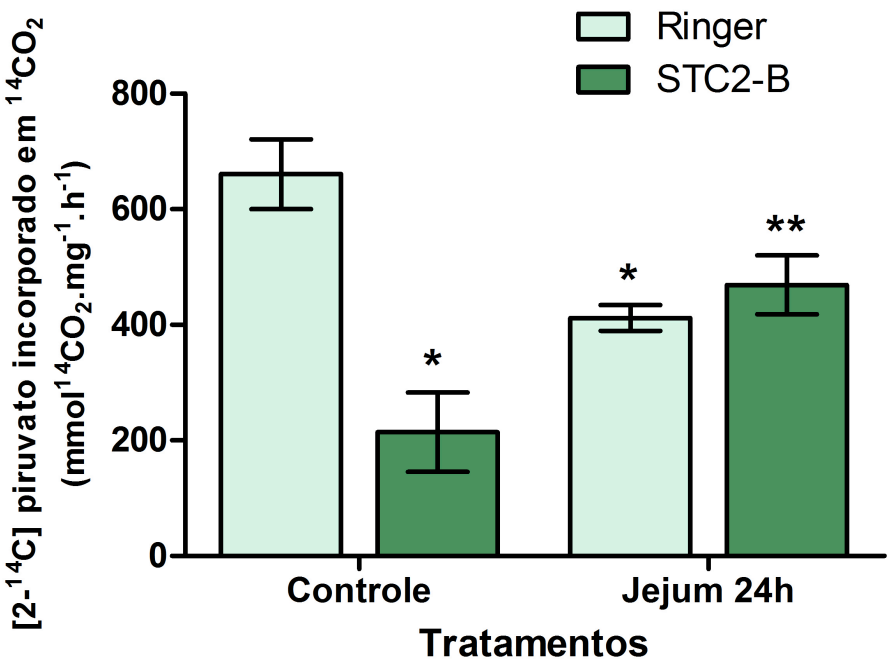


Figura 16. Oxidação de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC2 ou na ausência (ringer) (n=4-5). Resultados foram expressos em mmol de $^{14}CO_2$ formado por mg^{-1}.h-^{1}. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle/ringer. ** representa diferença significativa em relação a STC2-B controle (P<0,05).

4.2.3. Estudo *in vitro* da ação da STC1 sobre a incorporação do ^{14}C [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol

A STC1 na concentração B=0,1ng/mL não alterou significativamente a incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C] piruvato em ^{14}C-glicerol no TAM de ratos controles (alimentados) e em ratos submetidos a jejum de 48h. Nos grupos jejum/ringer (24 e 48h) ocorreu uma diminuição de cerca de 50% (P<0,05) na incorporação do ^{14}C piruvato em glicerol, em relação ao grupo controle/ringer. Além disso, a incubação em presença de STC1 na concentração B=0,1ng/mL aumentou significativamente a formação de ^{14}C-glicerol nos tecidos de animais em jejum de 24 h, chegando a valores semelhantes aqueles do grupo controle/ringer (alimentado) (Figura 17).

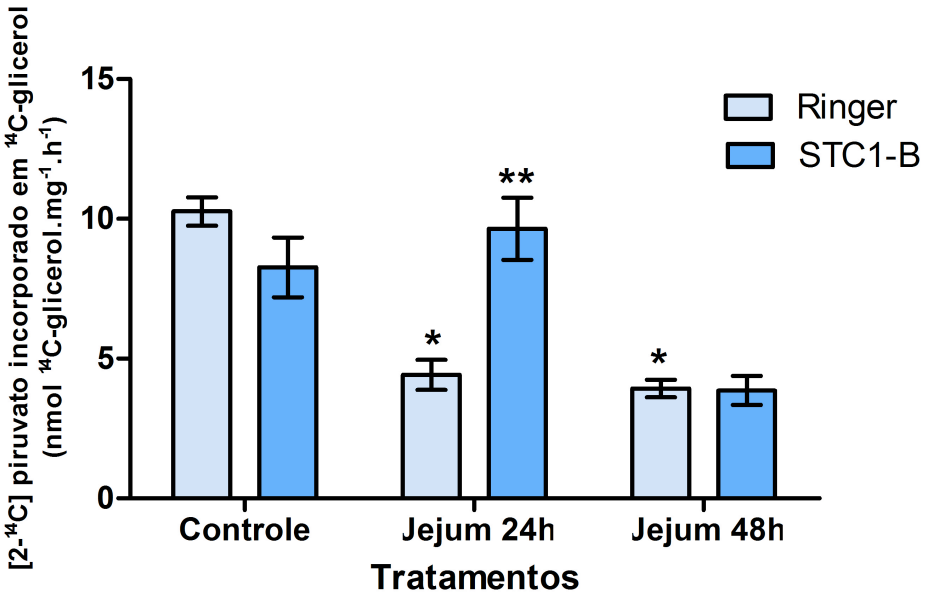


Figura 17. Formação de glicerol a partir de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 ou na ausência (ringer) (n=6-10). Resultados foram expressos em nmol de ^{14}C-glicerol formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle; **representa diferença significativa em relação ao grupo jejum/ringer 24 horas (P<0,05).

4.2.4. Estudo *in vitro* da ação da STC2 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-glicerol

A STC 2 na concentração (B=0,1ng/mL) não alterou significativamente a incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C] piruvato em ^{14}C-glicerol no TAM de ratos controles (alimentados) e de ratos em jejum 24 e 48horas. Os grupos jejum/ringer 24 e 48horas diminuíram em cerca de 50% (P<0,05) a incorporação do ^{14}C piruvato em glicerol no TAM em relação ao grupo controle/ringer (Figura 18).

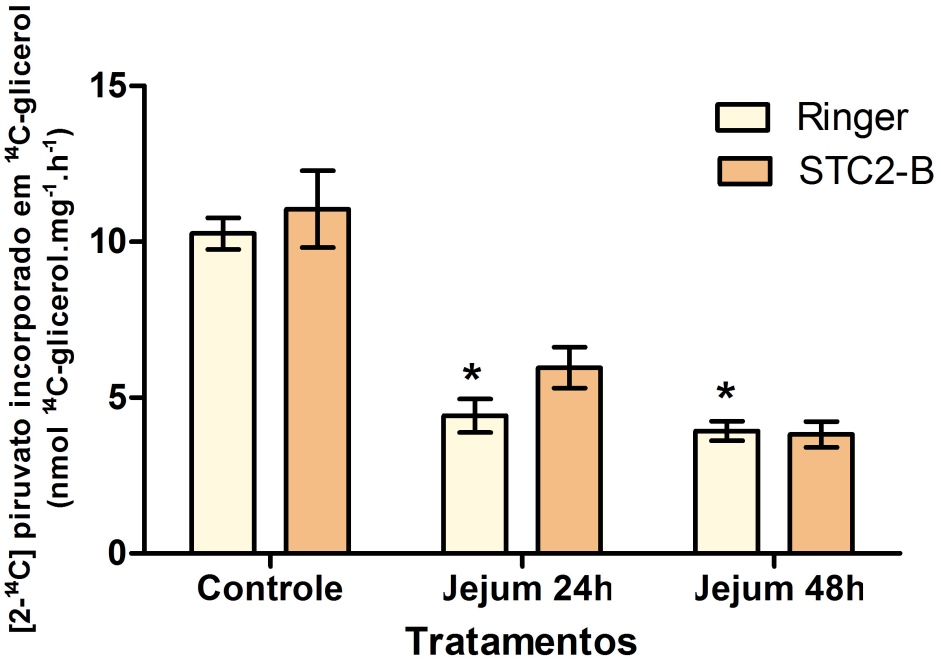


Figura 18. Formação de glicerol a partir de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC2 ou na ausência (ringer) (n=6-10). Resultados foram expressos em nmol de ^{14}C-glicerol formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle/ringer (P<0,05).

4.2.5. Estudo *in vitro* da ação da STC1 sobre a incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo

A STC1 na concentração (B=0,1ng/mL) diminui em 50% (P<0,05) a formação de ácidos graxos a partir de ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato no TAM de ratos controles (alimentados). O jejum 24 e 48horas diminui significativamente (P<0,05) a incorporação de [2-^{14}C]-piruvato em ácido graxos, quando comparado ao grupo controle/ringer. No TAM de ratos em jejum 24 e 48 horas, a STC 1 na concentração (B=0,1ng/mL) não alterou significativamente a formação de ácidos graxos a partir de ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato (Figura19).

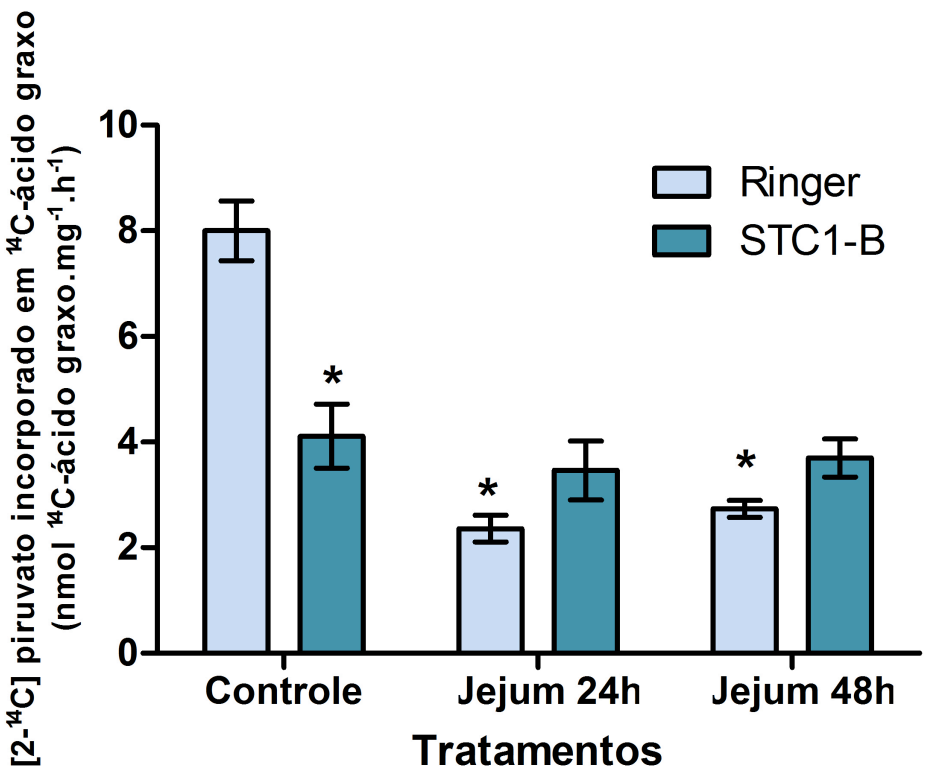


Figura 19. Formação de ácido graxo a partir de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 ou na ausência (ringer) (n=6-10). Resultados foram expressos em nmol de ^{14}C-ácido graxo formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle/ringer (P<0,05).

4.2.6. Estudo *in vitro* da ação da STC2 sobre a Incorporação do ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato em ^{14}C-ácido graxo

A STC2 na concentração (B=0,1ng/mL) não alterou significativamente a formação de ácidos graxos a partir de ^{14}C do [2-^{14}C]-piruvato no TAM de ratos controles (alimentados). O jejum 24 e 48horas diminui significativamente (P<0,05) a incorporação de [2-^{14}C]-piruvato em ácido graxos, quando comparado ao grupo ringer/controle. Contudo, no TAM de ratos em jejum 24 e 48 horas, a STC2 na concentração (B=0,1ng/mL) não alterou significativamente a formação de ácidos graxos a partir de ^{14}C do [2-^{14}C] piruvato (Figura 20).

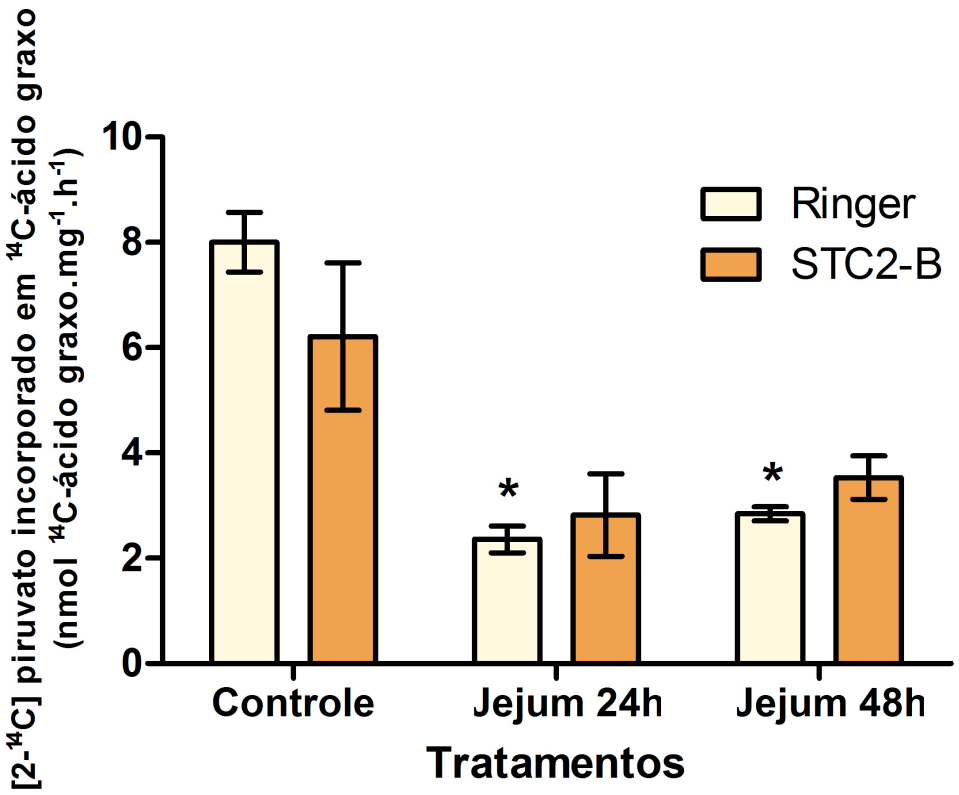


Figura 20. Formação de ácido graxo a partir de [2-^{14}C]-piruvato no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle e submetidos a 24 e 48 horas de jejum na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC2 ou na ausência (ringer) (n=4-10). Resultados foram expressos em nmol de ^{14}C-ácido graxo formado por $mg^{-1}.h^{-1}$. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa entre grupo controle/ringer (P<0,05).

4.2.7. Relação entre formação de glicerol e ácidos graxos na STC1

A razão da incorporação do [2-^{14}C] piruvato em glicerol/ incorporação do [2-^{14}C] piruvato em ácidos graxos é cerca de 1,7 vezes maior no TAB de ratos controle incubados em presença de STC 1 na concentração (B= 0,1ng/mL), quando comparada aquelas dos ratos controles sem hormônio. No jejum de 24horas a relação de formação glicerol/ácido graxo no TAM é de 1,8 vezes maior, quando comparada ao grupo ringer/controle, a incubação deste tecido em presença de STC 1 na concentração (B=0,1ng/ml) aumenta para 3,0 a relação em relação ao grupo ringer/controle. O jejum de 48horas não altera a relação de formação de glicerol/ácido graxos e o hormônio STC 1, na concentração utilizada neste estudo, não modificou esta relação (Figura 21).

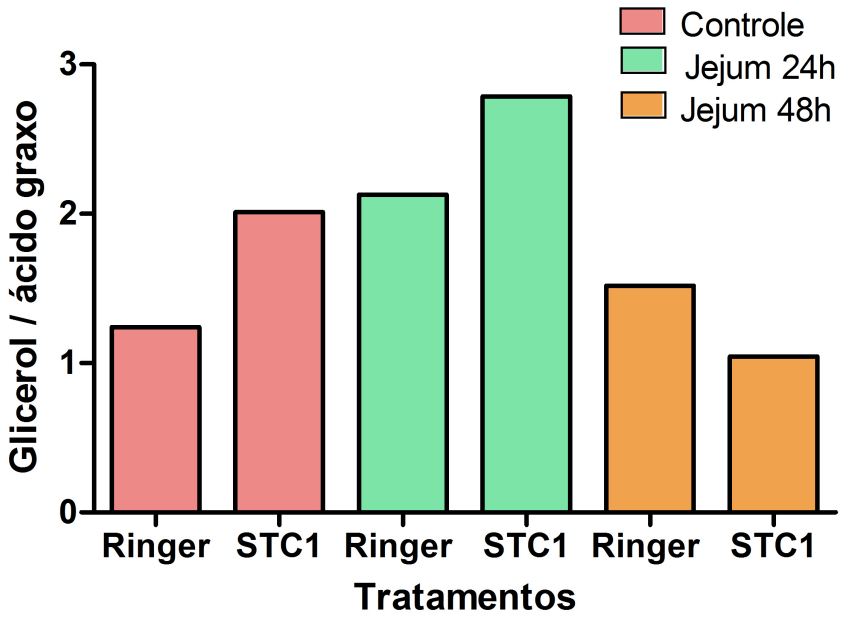


Figura 21. Relação entre a formação de ^{14}C-glicerol e a formação de ^{14}C-ácidos graxos a partir de [2-^{14}C]-piruvato [(nmol de glicerol. mg^{-1}.h^{-1}) / (nmol de ácido graxo. mg^{-1}. h^{-1})]. no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* alimentados e em jejum de 24 e 48 horas incubados com STC1 na concentração (B: 0,1ng/mL).

4.2.8. Relação entre formação de glicerol e ácidos graxos na STC2

A razão da incorporação do [2-^{14}C] piruvato em glicerol/ incorporação do [2-^{14}C] piruvato em ácidos graxos é cerca de 1,8 vezes maior no TAB de ratos em jejum de 24horas, quando comparada aquelas dos ratos controles/ringer. A STC 1 na concentração (B=0,1ng/ml) não alterou a relação de formação de glicerol/ácidos graxos no grupo jejum 24horas. O jejum de 48horas não alterou a relação de formação de glicerol/ácido graxos e o hormônio STC1, na concentração utilizada neste estudo, não modificou esta relação (Figura 22).

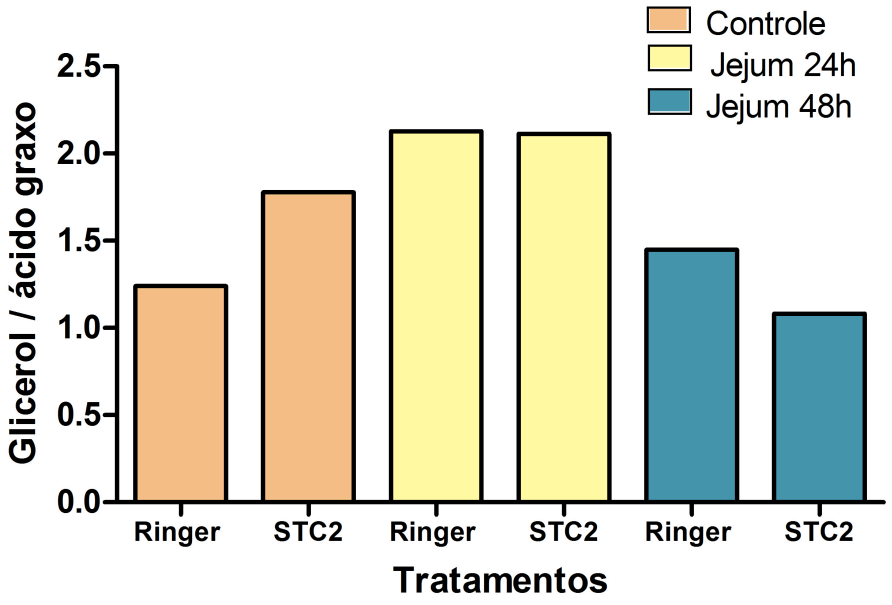


Figura 22. Relação entre a formação de ^{14}C-glicerol e a formação de ^{14}C-ácidos graxos a partir de [2-^{14}C]-piruvato [(nmol de glicerol. mg^{-1}.h^{-1}) / (nmol de ácido graxo. mg^{-1}. h^{-1})]. no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* alimentados e em jejum de 24 e 48 horas incubados com STC2 na concentração (B: 0,1ng/mL).

4.2.9. Estudo *in vitro* da ação da STC1 e STC2 sobre a atividade da enzima PEPCKc através da incorporação de $H^{14}CO_3$ em oxaloacetato

A atividade da enzima PEPCKc no TAM de animais controles (alimentados) não foi alterada significativamente na presença de STC 1 e STC 2 na concentração (B: 0,1ng/mL), quando comparada aquela do grupo ringer (Figura 23).

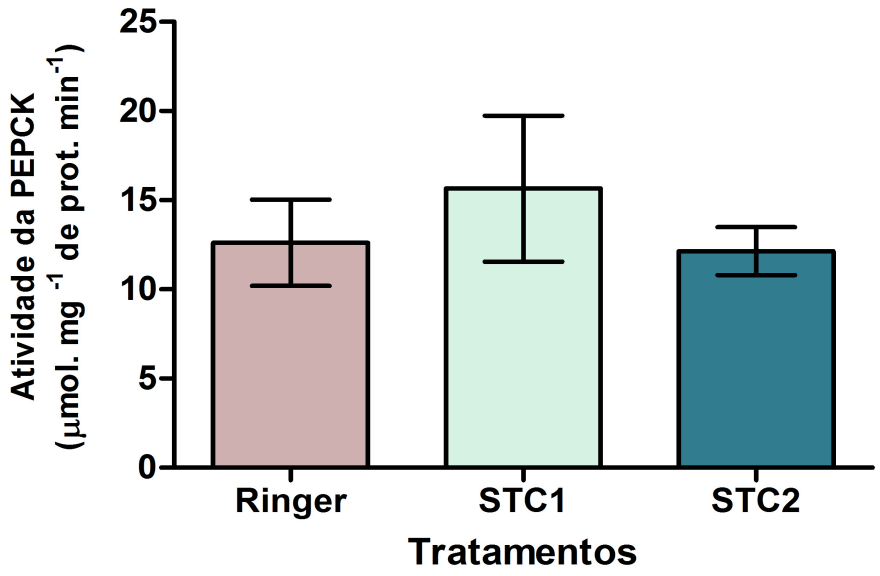


Figura 23. Atividade da enzima PEPCKc no tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus* em animais controle/alimentados na presença da concentração (B: 0,1ng/mL) de STC1 e STC2 ou na ausência (ringer) (n=5-11). Resultados foram expressos em µmol de $H^{14}CO_3$ incorporado por mg^{-1} de prot. min^{-1} As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média.

4.3. Dosagens séricas bioquímicas e hormonais

4.3.1 Avaliação da glicemia

O jejum de 24 e 48 horas reduziu significativamente (P<0,05) a concentração de glicose sérica, quando comparada aquela do grupo controle (alimentado) (Figura 24).

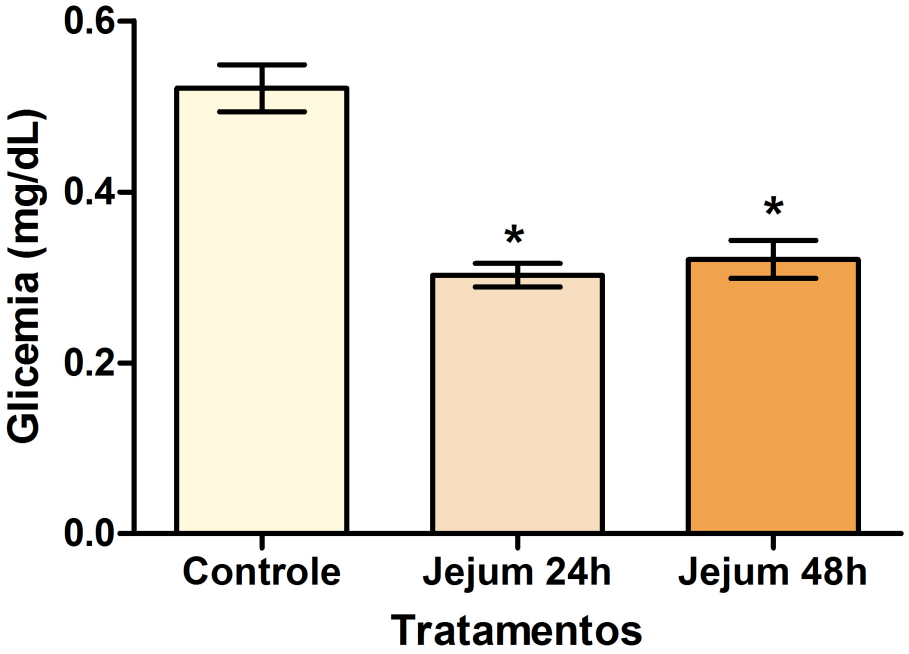


Figura 24. Dosagem sérica de glicose em *Rattus norvegicus* de animais controle (alimentados) ou submetidos ao jejum de 24 ou 48 horas. (n=5-17). Resultados foram expressos em mg de glicose /dL de plasma. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias ± erro padrão da média. *representa diferença significativa em relação ao grupo controle (P<0,05).

4.3.2 Avaliação do hormônio Leptina

O jejum de 48 horas reduziu significativamente (P<0,05) a concentração de leptina sérica, quando comparada aquela do grupo controle (alimentado) (Figura 25).

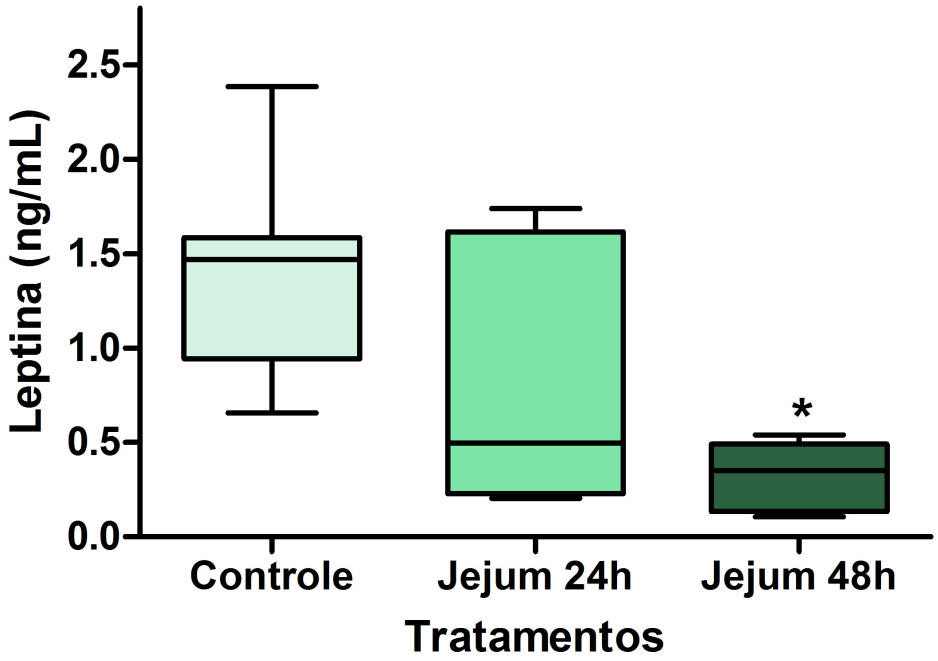


Figura 25. Dosagem sérica do hormônio leptina em *Rattus norvegicus* de animais controle (alimentados) ou submetidos ao jejum de 24 e 48 horas. (n=5-7) Resultados foram expressos em ng de leptina /mL de plasma. As colunas delimitam o intervalo interquartil, as linhas horizontais representam a mediana e as barras verticais indicam os percentis de 10 e 90, *representa diferença significativa em relação ao grupo controle (P<0,05).

5. DISCUSSÃO

Passados 175 anos da descoberta do hormônio stanniocalcina, seus efeitos fisiológicos e bioquímicos em mamíferos ainda são intrigantes. Até o momento, sabe-se que as stanniocalcinas são uma pequena família de hormônios polipeptídicos – STC1, STC2 e as big Stanniocalcinas (3 variantes com alto peso molecular [84, 112 e 135 kDa] encontradas primeiramente em ovários de roedores e de bovinos e posteriormente em adrenais e em adipócitos de ratos) (PACIGA et al., 2005). As diferenças na estrutura, na expressão e na ligação ao receptor concedem a STC1 e a STC2, especificidade e diferenças funcionais (MCCUDDEN et al., 2002; CHANG et al, 2003).

Apesar da dificuldade de localizar e de caracterizar os receptores para as STCs, a descoberta de sítios de ligação para este hormônio na membrana mitocondrial de roedores (MCCUDDEN et al., 2002) e sua ação como desacopladora da respiração celular (ELLARD et al., 2007) sugerem que estes hormônios exercem um papel importante sobre o metabolismo intermediário de mamíferos. Nesta mesma linha de pesquisa, nosso laboratório também identificou ações importantes da STC1 e da STC2 sobre o metabolismo da glicose e de aminoácidos no músculo e no fígado de ratos (GONÇALVES, 2012; ROSSETTI, 2013).

O presente estudo demonstra pela primeira vez que as STC1 e STC2, também desempenham funções de hormônios reguladores do metabolismo de lipídios no TAB epididimal e no TAM de ratos. Os resultados mostram que, conforme o tecido estudado, as ações metabólicas desses hormônios podem ser antagônicas. Devido à ausência na literatura consultada de estudos pontuais sobre os efeitos metabólicos das

STC1 e STC2 sobre o metabolismo intermediário e em especial sobre o metabolismo de lipídeos, a discussão deste trabalho apresenta poucos estudos recentes.

5.1. Ações da STC1 e da STC2 sobre o tecido adiposo branco epididimal de *Rattus norvegicus*

O tecido adiposo branco é um órgão dinâmico com intensa atividade metabólica, capaz de armazenar energia e mobilizá-la quando ocorre necessidade de substrato energético para a manutenção da homeostase (FLIER, 2004). O tecido adiposo branco possui intensa resposta lipolítica devido à presença de receptores β-adrenérgicos. No presente trabalho foi utilizado o tecido adiposo branco epididimal, que segundo Frasson (2012) seria menos responsivo as condições energéticas sistêmicas do que o tecido adiposo branco retroperitoneal. Outros estudos co-localizaram a presença de STC1 e perilipinas, proteína importante no processo de mobilização de lipídeos, no tecido adiposo branco e marrom (PACIGA et al., 2005; PACIGA etal., 2003; SERLACHIUS etal., 2004). No presente estudo, em ratos alimentados, a STC2 estimula a síntese de TAG-glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato, demonstrando a participação deste hormônio sobre o controle da via gliceroneogênica. A concentração de STC2 mais efetiva sobre a formação de TAG-glicerol foi a concentração A (0,01ng/mL). No presente estudo não foi verificada alteração significativa da atividade da PEPCKc em presença da concentração B (0,1ng/mL) de STC2. Nesta concentração de STC2 a formação TAG-glicerol diminui em relação a concentração A, explicando, em parte, o resultado da atividade da PEPCKc.

A gliceroneogênese tem uma participação importante (56%) na formação de G3P mesmo em animais alimentados com a dieta balanceada (FRASSON, 2012). Altos níveis de AGL no sangue interferem na utilização de glicose pelo músculo e promovem resistência à insulina (MORENO & BRITO, 2012). A STC2 aumentou a formação de TAG-glicerol no TAB, reduziria os níveis de AGL circulantes, aumentaria a utilização de glicose pelo músculo. Uma classe de drogas chamadas de tiazolidinedionas utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2, induz aumento da atividade da PEPCKc no tecido adiposo branco, aumentando a atividade da via gliceroneogênica e, assim, a síntese de triacilglicerol no TAB e reduzindo os níveis de AGL no sangue. Recentemente, em nosso laboratório foi demonstrado que a STC1 diminui a produção de glicose via gliconeogênese renal (trabalho submetido). Desta forma, a STC1 e STC2 regulariam a concentração de glicose circulante via gliconeogênese renal e reesteficação dos ácidos graxos livres via gliceroneogênese no TAB. Entretanto, experimentos sobre o efeito de outras concentrações de STC2 sobre a atividade e a expressão do gene da PEPCKc serão necessários para esclarecer o efeito deste hormônio sobre a gliceroneogênese.

A oxidação e a síntese de ácidos graxos a partir de [2-^{14}C] piruvato não foram alteradas pela STC2 no tecido epididimal de ratos alimentados.

No presente estudo os ratos foram submetidos ao jejum por 24 e 48 horas. No tecido epididimal dos ratos em jejum foi verificada uma redução marcante na formação de TAG-glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato, mesmo nos animais submetidos à restrição de alimento de 48 horas. Na literatura o jejum de 48 horas aumenta marcadamente a síntese de TAG-glicerol no TAB (RESHEF et al., 1970; FRASSON et al., 2012), contudo, existe uma diferença de resposta entre o tecido adiposo epididimal e retroperitonial quando submetidos ao mesmo estímulo. Esta

diferença estaria relacionada ao papel exercido por cada depósito de gordura sobre o metabolismo energético do organismo: o tecido adiposo epididimal tem um papel no controle metabólico local; o retroperitoneal está mais envolvido na homeostase energética do organismo como um todo. Além disso, estudo *in vivo* em ratos demonstrou que a atividade da PEPCKc no tecido adiposo epididimal é duas vezes menor que aquela do tecido adiposo mesentérico (NYE et al., 2008). Em ratos wistar em crescimento, alimentados com uma dieta rica em carboidrato (63%) e baixo teor de proteína (17%), no TAB epididimal a expressão da PEPCK não diferiu do grupo controle (dieta padrão) (BUZELLE et al.; 2010). Desta forma, para que ocorra aumento da atividade gliceroneogênica estimulada pelo jejum no tecido adiposo epididimal, será necessário um maior tempo de jejum. Recentemente, foi demonstrado que o tratamento prolongado (18 horas) e curto (2 horas) com leptina reduz a atividade gliceroneogênica e da PEPCKc no tecido epididimal de ratos (JAUBERT et al., 2012). No presente estudo a concentração plasmática de leptina somente reduz de forma significativa às 48 horas de jejum e reforça a necessidade de um tempo maior de jejum para aumentar a atividade gliceroneogênica no tecido adiposo epididimal. Entretanto, não pode ser descartada a diferença de tratamento no biotério entre os ratos utilizados neste trabalho e aqueles utilizados nos trabalhos onde observa-se aumento da capacidade gliceroneogênica às 48 horas de jejum.

No tecido adiposo epididimal de ratos em jejum de 24 e 48 horas a STC2, nas concentrações estudadas, perde sua capacidade de estimular a atividade gliceroneogênica. Além disso, a oxidação e a formação de ácido graxo a partir de [2-^{14}C] piruvato estão reduzidas no TAB dos ratos em jejum, nos tecidos incubados em presença de STC2, sugerindo menor formação de acetil-CoA e de oxaloacetato e, consequentemente, de G3P e CO_2. Contudo, a relação glicerol/ácido graxo mostra que

no jejum de 24 horas a STC2 na concentração (A: 0,01ng/mL), ainda estimula a carboxilação do piruvato a G3P, porém a capacidade gliceroneogênica é menor que no grupo alimentado. Nestes animais os níveis de glicose circulante estão 50% reduzidos e, provavelmente, a atividade lipolítica está aumentada, para liberar AGL como substrato energético aos tecidos.

A STC1 nas concentrações utilizadas no presente estudo não alterou significativamente a gliceroneogênese, a síntese de ácidos graxos ou a oxidação de [2-^{14}C] piruvato no tecido adiposo epididimal de ratos alimentados ou em jejum de 24 e 48 horas. Estudo realizado por Gonçalves (2012) demonstrou que a STC1, nas mesmas concentrações utilizadas neste trabalho, aumentou a incorporação do ^{14}C da glicose em lipídios totais no fígado de ratos alimentados, sugerindo aumento da formação de G3P via glicólise.

O controle da gliceroneogênese no TAB é realizado pela insulina, glicocorticóides, sistema nervoso simpático (quando os níveis de insulina estão baixos) que diminuem a atividade e expressão do gene da PEPCKc e a capacidade gliceroneogênica medida pela formação de TAG-glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato (MORENO & BRITO, 2012; FRASSON et al., 2012). Já a leptina inibiria a atividade gliceroneogênica e a expressão da PEPCKc no tecido adiposo epididimal (JAUBERT et al., 2012). O glucagon estimularia a atividade desta via no TAB (MORENO & BRITO, 2012).

Serlachius e Andersson (2004) observaram aumento na expressão da STC1 em adipócitos durante seu estágio final de maturação. Os autores relacionaram a presença da SCT1 com a resistência dessas células à apoptose e eles sugerem que a STC1 estaria envolvida com a homeostase do tecido adiposo. A STC1 se localizava especialmente na superfície das gotas lipídicas. Essas gotas são envolvidas por uma

camada única de fosfolipídeos cuja composição é bastante diferente da membrana plasmática. Essa hemimembrana é composta por diversas proteínas como a perilipina A e B, cuja função é controlar a esteroidogênese e/ou o metabolismo de lipídeos, pois sofre a ação da lípase hormônio sensível e lipase de triacilglicerol do adipócito. Observou-se que a STC1 se co-localiza com essa proteína, fator esse que pode também inferir um papel desse hormônio no metabolismo de lipídios. (PACIGA et al., 2003; MCCUDDEN et al., 2002). Contudo, efeitos da STC2 em adipócitos não são conhecidos.

Os resultados deste trabalho sugerem que a STC2 seria um hormônio candidato à regulação da via gliceroneogênica no TAB, provavelmente, via ação parácrina.

5.2. Ações da STC1 e da STC2 sobre o tecido adiposo marrom de *Rattus norvegicus*

Adipócitos marrons são termogênicos e, portanto, participam ativamente na regulação da temperatura corporal, produzindo e dissipando calor. O funcionamento do TAM depende do fornecimento adequado de G3P, necessário para a esterificação de AGs sintetizados pelo tecido, oriundos da hidrólise do TAG tecidual ou captados da circulação. O TAM, assim como o TAB, possui três vias conhecidas de geração de G3P: a) a partir da glicose pela via glicolítica; b) a partir de intermediários de 3 carbonos, como lactato, piruvato e aminoácidos glicogênicos, pela via gliceroneogênica; c) por fosforilação direta do glicerol pela GK.

O TAM possui uma atividade metabólica alta, pois na membrana interna da mitocôndria existe uma proteína desacopladora (UCP-1), que é a responsável por sua função termogênica. Esta proteína é ativada por AGs e inibida por nucleotídeos purínicos di ou trifosfato, aumentando ou diminuindo o acoplamento entre a síntese de ATP e a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CANNON et al., 2004).

No presente estudo, o hormônio STC1 na concentração (B: 0,1ng/mL) quando incubado com o TAM de ratos alimentados reduziu marcadamente a capacidade de síntese de AGs a partir de [2-^{14}C] piruvato. Está bem estabelecido na literatura, que os AGs ativam a UCP- 1 e aumentam sua expressão gênica e, assim, estimulam a atividade do TAM (LOWELL & SPIEGELMAN, 2000). Entretanto, a STC1 não alterou no TAM de ratos alimentados a capacidade de síntese de TAG-glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato, nem a atividade da enzima chave da via gliceroneogênica a PEPCKc. Além disso, a STC1 e STC2 reduziram marcadamente a formação de $^{14}CO_2$ a partir de [2-^{14}C] piruvato, sugerindo uma redução da atividade da enzima acetil-CoA carboxilase e do complexo piruvato desidrogenase, levando a uma redução de oxaloacetato ou formação de AGs. Os resultados sugerem que nos ratos alimentados com uma dieta balanceada a STC1 reduziria a atividade termogênica do TAM regulando a formação de AGs e, desta forma, a reesterificação via gliceroneogênese.

No fígado de ratos alimentados com dieta balanceada a STC1 e a STC2 também reduziram marcadamente a oxidação da ^{14}C-glicose. A relação ADP/ATP neste tecido está aumentada em presença de STC1 e STC2 (GONÇALVES, 2012).

Moura e colaboradores (2005) demonstraram que a exposição de ratos alimentados com uma dieta balanceada a 4˚C por 10 dias induz aumento no peso do TAM e na síntese de AGs. A exposição destes animais ao frio, também, estimula a

atividade da enzima acetil-CoA carboxilase e do complexo piruvato desidrogenase em ambos os grupos.

A restrição alimentar dos animais por 24 e 48 horas reduziu significativamente a formação de TAG-glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato. Está bem documentado na literatura, que o jejum de 48 horas aumenta significativamente a capacidade gliceroneogênica no TAM (FESTUCCIA et al., 2003; BROETTO & BRITO, 2012). Esta diferença na resposta ao jejum pode ser explicada, em parte, pela diferença de tratamento dos ratos no biotério. Os ratos utilizados no presente estudo foram mantidos, após o desmame, em racks ventiladas sem contato com o meio externo. Os resultados sugerem que às 48 horas de jejum não são suficientes para ativar a via gliceroneogênica, sendo necessário testar outro tempo de jejum.

No TAM dos animais em jejum de 24 horas a STC1 na concentração (B: 0,1ng/mL) aumentou em cerca de 50% a formação de TAG-glicerol a partir de [2-^{14}C] piruvato. Este resultado é oposto ao verificado no TAB, onde a STC2 perde no jejum sua capacidade de estimular a gliceroneogênese. No jejum de 24 horas o estímulo da capacidade gliceroneogênica induzida pela STC1 aumentaria a concentração de TAG no TAM. Na ativação da termogênese no TAM, a hidrólise de TAGs armazenados no tecido é primordial para a produção de AGs, desta forma o aumento destas reservas de TAG estimuladas pela STC1 no período de jejum garantiria a função termogênica deste tecido. A relação de incorporação de piruvato em glicerol e em ácidos graxos no TAM de ratos em jejum de 24 horas, confirma que a STC1 estimulou a carboxilação do piruvato a α-glicerofosfato no jejum.

O jejum de 24 e 48 horas reduz significativamente a formação de ácido graxo, mas não altera a oxidação de [2-^{14}C] piruvato. A STC1 na concentração estudada não alterou estes dois parâmetros no TAM nos tempos de jejum estudados.

A STC2 não apresentou nenhum efeito significativo sobre as sínteses de TAG-glicerol e de AGs no TAM de ratos alimentados ou em jejum.

O presente estudo demonstra que os hormônios STC1 e STC2 controlam a atividade gliceroneogênica, a síntese de ácidos graxos e a oxidação de substrato nos tecidos adiposo branco epididimal e marrom. Desta forma, estes hormônios peptídios participam da homeostase de lipídios no TAB e da regulação da utilização da glicose circulante pelos tecidos periféricos. Além disso, a STC1 participa do controle da termogênese no TAM via gliceroneogênese, síntese de ácido graxos e atividade da enzima acetil-CoA carboxilase e do complexo piruvato desidrogenase.

Este trabalho consolida a capacidade de regulação do metabolismo intermediário pelos hormônios STC1 e STC2 humanas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram que as STCs 1 e 2 desempenham funções como substâncias reguladoras do metabolismo de lipídios no TAB epididimal e no TAM. Os hormônios STC1 e STC2 controlam a atividade gliceroneogênica, a síntese de ácidos graxos e a oxidação de substrato nos tecidos adiposo branco epididimal e marrom. Desta forma, estes hormônios peptídios participam da homeostase de lipídios no TAB e da regulação da utilização da glicose circulante pelos tecidos periféricos. Além disso, a STC1 participa do controle da termogênese no TAM via gliceroneogênese, síntese de ácido graxos e atividade da enzima acetil-CoA carboxilase e do complexo piruvato desidrogenase.

Tanto STC1 quanto STC2 utilizadas neste estudo foram demonstradas em baixas concentrações quando comparadas com outros trabalhos encontrados na literatura. As Stanniocalcinas são hormônios intrigantes e este trabalho elucida uma pequena parte da sua ampla complexidade de ação, consolidando a capacidade de regulação do metabolismo intermediário pelos hormônios STC 1 e STC 2 humanas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERWALD, C.; RODEN, M. Adipotoxicity and the insulin resistance syndrome. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v. 3, p. 310-319, 2004.

BALLARD, F.J.; HANSON, R.W. Phosphoenol pyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. **Biochemical Journal**, v. 104, p. 866-871, 1967.

BEALE, E.G.; HAMMER, R.E.; ANTOINE, B.; FOREST, C. Glyceroneogenesis comes of age. **FASEB Journal**, v. 16, p. 1695-1696. 2002.

BJORNDAL, B.; BURRI, L.; STAALESEN, V.; SKORVE, J.; BERGE, R.K. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. **Journal of Obesity**, p. 490-650, 2011.

BOSTROM, P., WU, J., JEDRYCHOWSKI, M.P., KORDE, A., YE, L., LO, J.C., RASBACH, K.A., BOSTROM, E.A., CHOI, J.H., LONG, J.Z. A PGC1-a-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogene- sis. **Nature**, v. 481, p. 463–468, 2012.

BOTION, L.M.; BRITO, N.A.; BRITO, S.R.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. Glucose contribution to in vivo synthesis of glyceride-glycerol and fatty acids in rats adapted to a high-protein, carbohydrate free diet. **Metabolism**, v. 47, p. 1217-1221, 1998.

BOTION, L. M.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. **Hormone and Metabolic Research**, v. 27, p. 310-313, 1995.

BRITO M.N.; BRITO, N.A.; BRITO, S.R.; MOURA, M.A.; KAWASHITA, N.H, KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet**. American Journal of Physiology**, v. 276, p. R1003- 1009, 1999.

BRITO, S.C.R.; MOURA, M.A.F.; KAWASHITA, N.H.; BRITO, M.N.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. Glucose uptake and glycolytic flux in adipose tissue from rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. **Metabolism**, v. 50, p. 1208-1212, 2001.

BROETTO, F.N.; BRITO, M.N. Tecido adiposo marrom e obesidade em humanos. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, p. 121-135, 2012.

BRONDANI, L.A.; ASSMANN, T.S.D.; KULLMANN, G.C.; GROSS, J.L.; CANANI, L. H.; CRISPIM, D. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, p. 215-225, 2012.

BUZELLE, S.L.; SANTOS, M.P.; BAVIERA, A.M.; LOPES, C.F.; GARÓFALO, M.A.R.; NAVEGANTES, L.C.C. A low-protein, high-carbohydrate diet increases the adipose lipid content without increasing the glycerol-3-phosphate or fatty acid content in growing rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, p. 1157–65, 2010.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiological Reviews**. v. 84, p.277-359, 2004.

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

CHANG, A.C; JANOSI, J.; HULSBEEK, M.; DE JONG, D.; JEFFREY, K.J.; REDDEL, R.R. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 112, p. 241-247, 1995.

CHAVES, V.E. Effects of hypercaloric diet and sympathetic nervous system on glycerol-3-phosphate generation in white and brown adipose tissue of rats. **Tese de doutorado –Fisiologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo** – São Paulo, 2008.

CHESTER-JONES, I.; CHAN, D.K.; HENDERSON, I.W.; MOSLEY, W.; SANDOR, T.; VINSON, G.P.; WHITEHOUSE, B. Failure of corpuscles of Stannius of the European eel (Anguilla L.) to produce corticosteroids in vito. **Journal of Endocrinology**, v. 33, p. 319-320, 1965.

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. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1509-17, 2009.

DE MEIS, L. Brown adipose tissue Ca2+-ATPase: uncoupled ATP hydrolysis and thermogenic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 41856-61, 2003.

DE NIU, P.; RADMAN, D.P.; JAWORSKI, E.M.; DEOL, H.; GENTS, R.; SU, J.; OLSEN, H.S.; WAGNER, G.F. Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 162, p. 131-144, 2000.

DEOL, H.K.; VARGHESE, R.; WAGNER, G.F.; DIMATTIA, G.E. Dynamic regulation of mouse ovarian stanniocalcin expression during gestation and lactation. **Endocrinology**, v. 141, p. 3412-3421, 2000.

DESNOYERS, F.; VODOVAR, N. Estude histologyque comparé chez le porc at le rat du tissue adiperix perirenal au stade de son apparition. **Biology of the Cell**, v. 29, p. 177-182, 1977.

DIMATTIA, G. E.; VARGHESE, R.; WAGNER, G. F. Molecular cloning and characterization of stanniocalcin-related protein. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 146, p. 137-40, 1998.

DUNCAN, R.E.; AHMADIAN, M.; JAWORSKI, K.; SARKADI-NAGY, E.; SUL, H.S. Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p. 79-101, 2007.

ELLARD, J.P.; MCCUDDEN, C. R.; TANEGA, C.; JAMES, K.A.; RATKOVIC, S.; STAPLES, J.F.; WAGNER, G.F. The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 264, p. 90-101, 2007.

FARMER, S.R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metabolism**, v. 4, p. 263-73, 2006.

FENWICK, J.C.; SO, Y.P. A perfusion study of the effect of stanniectomy on the net influx of calcium 45 across an isolated eel gill. **Journal of Experimental Zoology**, v. 188, p. 125-131, 1974.

FESTUCCIA, W.T.; GUERRA-SÁ, R.; KAWASHITA, N.H.; GARÓFALO, M.A.; EVANGELISTA, E.A.; RODRIGUES, V. Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. **American Journal Physiology- Regulatory, Integradive and Comparative Physiology.** v.284(6), p. R1536- R1541, 2003.

FILVAROFF, E.H.; GUILLET, S.; ZLOT, C.; BAO, M.; INGLE, G.; STEINMETZ, H.; HOEFFEL, J.; BUNTING, S.; ROSS, J.; CARANO, R.A.; POWELL-BRAXTON, L.; WAGNER, G.F.; ECKERT, R.; GERRITSEN, M.E.; FRENCH, D.M. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. **Endocrinology**, v. 143, p. 3681-90, 2002.

FLIER, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell** 2004, v. 23, p. 337–50, 2004.

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

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 216-229, 2006.

FRASSON, D.; BOSCHINI, R.P.; CHAVES, V.E.; DOS SANTOS, M.E.; PAULA GOMES, S.; VALENTIM, R.R.; GARÓFALO, M.A.; NAVEGANTES, L.C.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. 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**. v.61(10), p.1473-85, 2012.

GONÇALVES, A.S. Efeitos dos hormônios peptídicos stanniocalcina 1 e 2 sobre o metabolismo da glicose em ratos. **Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas: Fisiologia) – Departamento de Fisiologia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

GUSIK, T.J.; MARVAR, P.J.; CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M.; KORBUT, R. Peri-vascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, p. 591-610, 2007.

HAHN, P.; KIRBY, L.T. The effects of catecholamines, glucagon, and diet on enzyme activities in brown fat and liver of the rat. **Canadian journal of biochemistry**, v. 52, p. 739-743, 1974.

HANSON, R.W.; RESHEF, L. Gliceroneogenesis revisited. **Biochemistry**, v. 85, p. 1199 -1205, 2004.

HANSON, R.W.; RESHEF, L. Regulation of phosphoenol pyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, p. 581, 1997.

HASILO, C.P.; MCCUDDEN, C. R.;GILLESPIE, J.R.J.; JAMES, K.A.; HIRVI, E.R.; WAGNER, G.F. Nuclear targeting of big stanniocalcin to mammary gland alveolar cells during pregnancy and lactation. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 289, p. 634- 642, 2005.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiology & Behavior**, v. 83, p. 653-8, 2004.

HERTZEL, A.V.; THOMPSON, B.R; WICZER, B.M.; BERNLOHR, D.A. Lipid metabolism in adipose tissue. **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes,** v. 5, p. 277- 304, 2008.

HOLM, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 1120–1124, 2003.

HULOWA, I.; KAWAUCHI, H. Assignment of disulfite linkages in chum salmon stanniocalcin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, p. 295-299, 1999.

ISHIBASHI, K.; IMAI, M. Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 282, p. 367-375, 2002.

ITO, D.; WALKER, J.R.; THOMPSON, C.S.; MOROZ, I.; LIN, W.; VESELITS, M.L.; HAKIM, A.M.; FIENBERG, A.A.; THINAKARAN, G. Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, p. 9456-9469, 2004.

JAUBER, A.M.; PENOT, G.; NIANG, F.; DURANT, S.; FOREST, C. Rapid nitration of adipocyte phosphoenolpyruvate carboxykinase by leptin reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release. **PLoS One.** v. 7(7), p. e40650, 2012.

JENSEN, M.D.; EKBERG, K.; LANDAU, B.R. Lipid metabolism during fasting, **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 281, p. E789, 2001.

KALHAN, S.C.; MAHAJAN, S.; BURKETT, E.; RESHEF, L.; HANSON, R.W. Glyceroneogenesis and the source of glycerol for hepatic triacylglycerol syntesis in humans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 12928-12931, 2001.

KAWASHITA, N.H.; FESTUCCIA, W.T.; BRITO, M.N.; MOURA, M.A.; BRITO, S.R.; GARÓFALO, M.A. Glycerokinase activity in brown adipose tissue: a sympathetic regulation? **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, p. 1185-1190, 2002.

KENNEDY, G.C. Hypothalamic obesity. Proc Royal Soc Med. 1966; 153: 1276 – 7.
LIN, C.; SU, C.; HWANG, P. Calcium- sesing receptor mediates Ca2+ homeostasis by modulating expression of PTH and Stanniocalcin. **Endocrinology**, v. 155, p. 56-67, 2014.

LOWELL, B.B.; SPIEGELMAN, B.M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. **Nature**, v. 404, p. 652- 660, 2000.

LU, M.; WAGNER, G. F.; RENFRO, J. L. Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. 1356- 1362, 1994.

LUO, C. W.; PISARSKA, M. D.; HSUEH, A. J. Identification of a stanniocalcin paralog, stanniocalcin-2, in fish and the paracrine actions of stanniocalcin-2 in the mammalian ovary. **Endocrinology**, v. 146, p. 469-476, 2005.

MAJKA, S.M.; BARAK, Y. and KLEMM, D.J. Adipocyte Origins: Weighing the possibilities. **Stem Cells**, v. 29, p. 1034-1040, 2011.

MCCUDDEN, C. R.; JAMES, K.A.; WAGNER, G.F. Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 45249-58, 2002.

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. Stanniocalcin 2: characterization of the protein and its localization to human pancreatic alpha cells. **Hormone and Metabolic Research**, v. 3, p. 406-414, 1999.

MORENO, F.N.; BRITO, M.N. Regulação hormonal da gliceroneogênese. **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 5(1), p.161-173, 2012.

MOURA, M.A.F.; FESTUCCIA, W.T.; KAWASHITA, N.H.; GARÓFALO, M.A.; BRITO, S.R.C.; KETTEKHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. Brown adipose tissue glyceroneogenesis is activated in rats exposed to cold. **Pflugers Archieves**. v. 449(5), p. 463- 469, 2005.

NECHUSHTAN, H.; BENVENISTY, R.; BRANDEIS, R.; RESHEF, L. Glucocorticoids control phosphoenol pyruvate carboxykinase gene expression in a tissue specifc manner. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 6405, 1987.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 293, p. E444-E452, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIANG, F.; BENELLI, C.; RIBIE`RE, C.; COLLINET, M .; MEHEBIK-MOJAAT, N.; PENOT, G.; FOREST, C.; JAUBERT, A. Leptin Induces Nitric Oxide-Mediated Inhibition of Lipolysis and Glyceroneogenesis in Rat White Adipose Tissue. **The Journal of nutrition**, v. 141, p. 4-9, 2011.

NYE, C.K.; HANSON, R.W.; KALHAN, S.C. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 283(41), p. 27565-74, 2008.

OGAWA, M. Fine structure of the corpuscles of Stannius and the interrenal tissue in goldfish (carassius auratus Z.). **Zeitschrift fur Mikroskopisch-Anatomische Forschung**, v. 81, p. 174-189, 1967.

OLIVEIRA, G.T.; DA SILVA, R.S.M. Gluconeogenesis of hepatopancreas of Chasmagnathus granulata crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 188A, p. 1429-1435, 1997.

OWEN, O.E.; KALHAN, S.C.; HANSON, R.W. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 227, p. 304-09, 2002.

PACIGA, M.; HIRVI, E.R.; JAMES, K.; WAGNER, G.F. Characterization of big stanniocalcin variants in mammalian adipocytes and adrenocortical cells. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 289, p. E197-205, 2005.

PACIGA, M.; MCCUDDEN, C.R.; LONDOS, C.; DIMATTIA, G.E.; WAGNER, G.F. Targeting of big stanniocalcin and its receptor to lipid storage droplets of ovarian steroidogenic cells. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 278(49), p. 49549-54, 2003.

PÉNICAUD, L.; COUSIN, B.; LELOUP, C.; LORSIGNOL, A.; CASTEILLA, L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. **Nutrition**, v. 16, p. 903-8, 2000.

RADMAN, D. P. et al. Evidence for calcium-sensing receptor mediated stanniocalcin secretion in fish. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 186, p. 111-119, 2002.

RESHEF, L.; HANSON, R.W., BALLARD, F.J. Apossible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 5979-5984, 1970.

ROSSETTI, C.L. Ação dos hormônios stanniocalcina 1 e 2 sobre o metabolismo de aminoácidos em ratos. **Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas: Fisiologia) – Departamento de Fisiologia**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

SAELY, C.H.; GEIGER, K.; DREXEL, H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. **Gerontology**, v. 58, p. 15-23, 2012.

SERLACHIUS, M.; ANDERSSON, L.C. Upregulated expression of Stanniocalcin-1 during adipogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 296, p. 254-264, 2004.

SHI, H.; BARTNESS, T.J. White adipose tissue sensory nerve denervation mimics lipectomy-induced compensatory increases in adiposity. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, p. 514-520, 2005.

SILVA, J.E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 435-464, 2006.

SO, Y.P.; FENWICK, J.C. The in vivo and the in vitro effects of Stannius corpuscles extract on the branchial uptake of 45Ca in stanniectomized North American eel (Anguilla rostrata). **General and Comparative Endocrinology**, v. 37, p. 143-149, 1979.

SONG, H.; XU, B.; YI, J. Clinical significance of stanniocalcin-1 detected in peripheral blood and bone marrow of esophageal squamous cell carcinoma patients. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 31, p. 1- 35, 2012.

SPALDING, K.L.; ARNER, E.; WESTERMARK, P.O.; BERNARD, S.; BUCHHOLZ, B.A.; BERGMANN, O. Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature, 2008; 453(7196):783-7.

SUNDELL, K.; BJORSSON, B.T.; ITOH, H.; KAWAUCHI, H. Chum salmon (Oncorhynchus keta) stanniocalcin inhibits in vitro intestinal calcium uptake in atlantic cod (Gadus morhua). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 162, p. 489-495, 1992.

TAKAHASHI, M. Adipose tissue – An alternative source for therapeutic angiogenesis. **Circulation Journal**, v. 76, 2012.

TORDJMAN, J.; CHAUVET, G.; QUETTE, J.; BEALE, E.G.; FOREST, C.; ANTONIE, B. Thiazolidinediones block fatty acid release by inducing glyceroneogenesis in fat cell. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 18785-18790, 2003.

TORRES, I. L; CAMARO, G.D.; SILVEIRA-CUCCO, S.N.; MICHALOWSKI, M.B.; CORREA, J.B.; PERRY, M.L.; DALMAZ, C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO2 in hippocampal and cerebral cortex slices. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 111-116, 2001.

UTTER, M.F.; KURAHASHI, K.; Oxalacetate synthesizing enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 1, p. 758-763, 1955.

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

WAGNER, G.F.; DIMATTIA, G.E. The stanniocalcin family of proteins. **Journal of Experimental Zoology**, v. 305, p. 769-780, 2006.

WAGNER, G.F.;GUIRAUDON, C.C.; MILLIKEN, C.; COPP, D.H. Immunological and biological evidence for stanniocalcin-like hormone in human kidney. **Proceedings of the Natinal Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 1871-1875, 1995.

WAGNER, G. F.; HAMPONG, M.; PARK, C.M.; COPP, D.H. Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius. **General and Comparative Endocrinology**, v. 63, p. 481-91, 1986.

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

WATT, M.J.; SPRIET, L.L. Triacylglycerol lipases and metabolic control: implications for health ans disease. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 299, p. E162-E168, 2010.

WU, J.; BOSTROM, P.; SPARKS, L.M.; YE, L.; CHOI, J.H.; GIANG, A.; KHANDEKAR, M.; VIRTANEN, K.A.; NUUTILA, P.; SCHAART, G.; HUANG, K.; TU, H.; D. VAN MARKEN LICHTENBELT, W.; HOEKS, J.; ENERBACK, S.; SCHRAUWEN, P. AND SPIEGELMAN, B.M. Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. **Cell**, v. 150, p. 366-376, 2012.

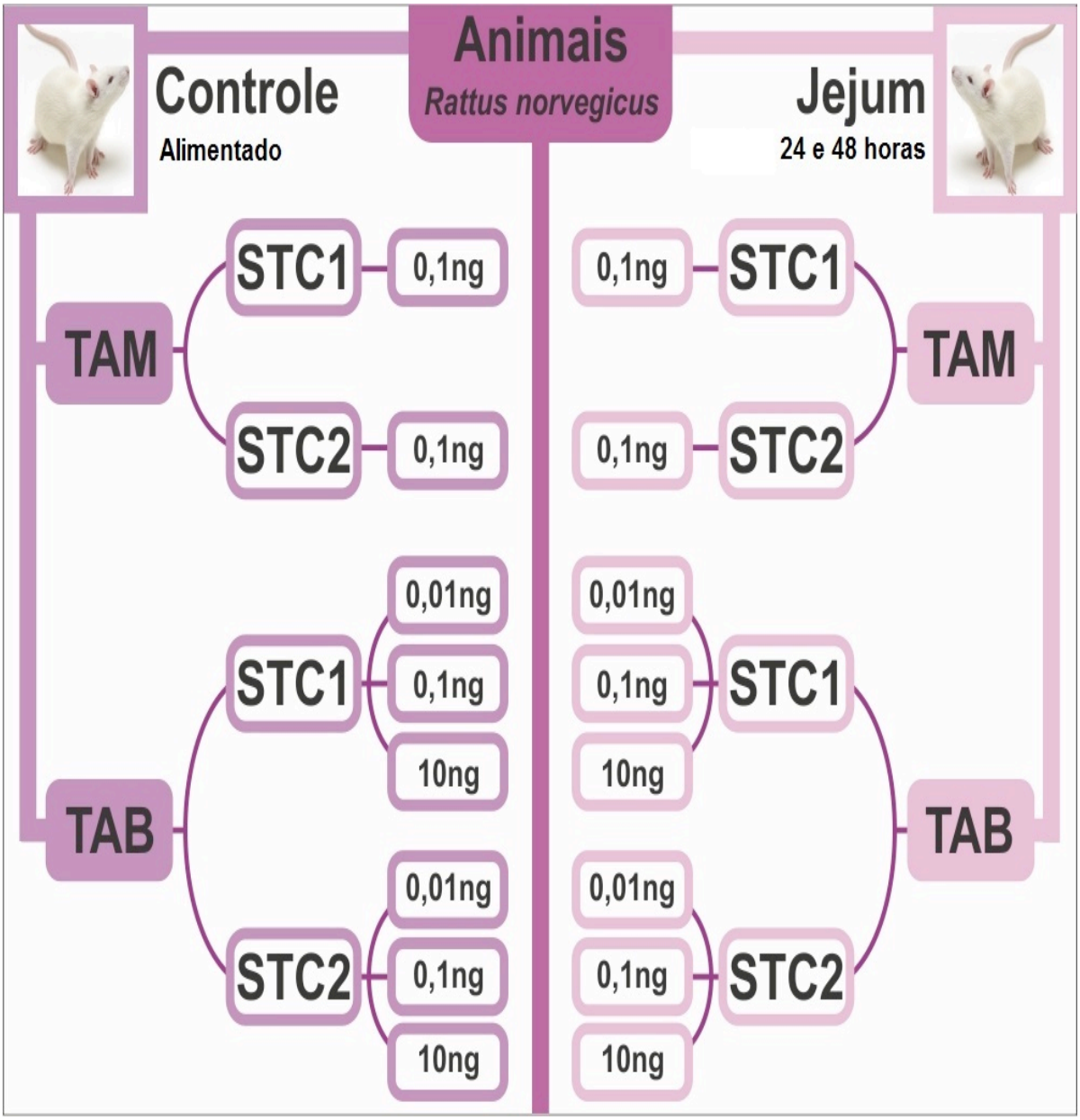
WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B.M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? **Genes & Development**, v. 27, p. 234-250, 2013.

YEUNG, B.H.Y.; LAW, A.Y.S.; WONG, C.K.C. Evolution roles of stanniocalcin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 349, p. 272-280, 2012.

ZAIDI, D.; JAMES, K.A.; WAGNER, G.F. Passive immunization of lactating mice with stanniocalcin-1 antiserum reduces mammary gland development, milk fat content and postnatal pup growth. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 291, p. 974-981, 2006.

ZHANG, K.; LINDSBERG, P.J.; TATLISUMAK, T.; KASTE, M.; OLSEN, H.S.; ANDERSSON, L.C. Stanniocalcin: a molecular guard of neurons during cerebral ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 3637-3642, 2000.

ZHANG, Y.Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J.M . Positional cloning of the mouse obese gene and its human homolog. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.

APÊNDICE – A:

Distribuição das STCs entre os grupos controle/alimentado, jejum 24 horas e jejum 48 horas