

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

**EFEITO, *IN VITRO*, DOS HORMÔNIOS STANNIOCALCINAS SOBRE A
GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA E RENAL DE RATOS ALIMENTADOS E EM
JEJUM**

SAMIR KHAL DE SOUZA

Porto Alegre

2020

**EFEITO, *IN VITRO*, DOS HORMÔNIOS STANNIOCALCINAS SOBRE A
GLICONEOGÊNESE HEPÁTICA E RENAL DE RATOS ALIMENTADOS E EM
JEJUM**

SAMIR KHAL DE SOUZA

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

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Porto Alegre

2020

Dedico esse trabalho a minha amada família

AGRADECIMENTOS

À Professora Roselis Silveira Martins da Silva por ter aceitado ser minha nova orientadora de doutorado, por me auxiliar na elaboração e execução das distintas etapas deste novo projeto.

Ao Professor Luiz Carlos Kucharski, ao Professor Paulo Ivo Homem Bittencourt e ao colega Tiago Leal Martins pelos ensinamentos e auxílio na realização de alguns protocolos experimentais.

Aos colegas de laboratório Débora Rocha, Elaine Sarápio, Everton Vogt, Rafael Fabres, Jorge Model e Matheus Lima por terem sido grandes companheiros de trabalho e bons amigos.

Aos meus colegas do PPG Fisiologia, em especial a Grace Pardo e Elaine Sarápio pelo companheirismo, amizade e ensinamentos.

Aos meus pais, Rosalinda e João Luiz, e meus irmãos Amanda e João Luiz Filho por me apoiarem e fazerem parte de minha vida.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À UFRGS por proporcionar um ensino público de qualidade.

RESUMO

A stanniocalcina (STC) é um hormônio glicoproteico descoberto em peixes e posteriormente detectado em mamíferos. As isoformas STC-1 e STC-2 são expressas em distintos órgãos de mamíferos como fígado e rins, sugerindo importante contribuição fisiológica destes hormônios. No jejum, com níveis de glicogênio diminuídos, a gliconeogênese hepática e renal contribuem para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose. O objetivo deste trabalho foi estudar o papel dos hormônios STC-1 e STC-2 humanos (hSTCs) sobre o metabolismo da glicose e do lactato no tecido hepático e renal de ratos alimentados e em jejum; determinar a capacidade da hSTC-1 de modular o sinal de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) sobre a atividade gliconeogênica renal. **Métodos:** Ratos *Wistar* machos adultos (n = 120) divididos em dois grupos: 1) alimentados, que receberam água e dieta padrão para roedores *ad libitum*; 2) em jejum de 24h para o estudo no fígado ou 48h para o estudo no rim. Os animais foram eutanasiados por decapitação, o sangue troncular coletado, fígado e rins excisados e fatiados para os experimentos *in vitro*. As fatias de fígado, de córtex e de medula renal do grupo controle foram incubados com Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) pH 7,4 ou Krebs Ringer Henseleit (KRH) pH 7,4, respectivamente, sem hSTCs. As fatias de fígado foram incubadas na presença de hSTC-1 e de hSTC-2 nas concentrações de 3,86pM e 38,6pM. Foram avaliadas no tecido hepático a atividade gliconeogênica, a partir de ¹⁴C-alanina e de ¹⁴C-lactato, a oxidação da ¹⁴C-glicose, a concentração de glicogênio, a síntese de glicogênio a partir de ¹⁴C-glicose, as expressões dos genes *Pck1*, *Stc1* e *Stc2*. No córtex e na

medula renal foram avaliados os efeitos da hSTC-1, nas concentrações de 0,386pM; 3,86pM; 386pM e 3860pM, sobre atividade gliconeogênica e oxidação do ^{14}C -lactato, assim como a expressão do gene *Pck1*. Foi determinado o papel da hSTC-1 sobre a modulação do sinal estimulador do cAMP sobre a gliconeogênese renal de ratos alimentados. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média e a análise estatística foi realizada de acordo com os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnoff. ANOVA de uma ou duas vias foi utilizada para determinar as diferenças significativas. Dados sorológicos e de expressão gênica foram analisados com teste *t* de Student. As diferenças foram significativas quando $P < 0,05$. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS sob o número de 29392. **Resultados: Fígado-** No estado alimentado foi detectada a presença de *Stc1*; após jejum de 24h, as expressões dos genes da *Stc1* e da *Stc2* aumentaram ($P < 0,05$) no fígado. No estado alimentado, a síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -alanina diminuiu com 38,6pM de hSTC-2 e foi acompanhada de redução na expressão da *Pck1* com 3,86 e 38,6pM de hSTC-2. Após o jejum de 24h, 38,6pM de hSTC-1 estimulou a gliconeogênese a partir de ^{14}C -lactato. Igualmente, 3,86 e 38,6pM de hSTC-2 elevaram a atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato no fígado de ratos jejuados. O aumento na expressão de *Pck1* ocorreu apenas na presença de 3,86pM. As hSTCs, nas concentrações utilizadas não alteraram a capacidade de oxidação da ^{14}C -glicose, a concentração de glicogênio e sua síntese a partir de ^{14}C -glicose no fígado de ratos alimentados ou jejuados (24h). **Rim-** No córtex renal de ratos alimentados somente 3860pM de hSTC-1 aumentou ($P < 0,05$) a capacidade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato e a expressão ($P < 0,05$) do

Pck1. Além disso, 0,386pM de hSTC-1 estimulou ($P < 0,05$) a oxidação de ^{14}C -lactato. No córtex renal de ratos em jejum (48h) a hSTC-1 nas concentrações utilizadas não modificaram a atividade gliconeogênica nem a oxidação de ^{14}C -lactato. A hSTC-1 não alterou a atividade gliconeogênica ou a oxidação a partir de ^{14}C -lactato na medula renal de ratos alimentados. No jejum (48h), 3,86pM de hSTC-1 aumentou ($P < 0,05$) a atividade gliconeogênica na medula renal a partir de ^{14}C -lactato, mas não aumentou ($P > 0,05$) a expressão da *Pck1* nem a oxidação de ^{14}C -lactato. A atividade gliconeogênica no córtex renal de ratos alimentados aumentou 50% ($P < 0,05$) com 25 μM de forskolin (FK) mais 2mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), mas 3,86pM de hSTC-1 inibiu ($P < 0,05$) este aumento. Tanto no córtex quanto na medula renal FK mais IBMX reduziram a oxidação de ^{14}C -lactato, porém a hSTC-1 não alterou esse resultado.

Conclusão: O presente trabalho demonstra a participação das hSTC-1 e hSTC-2 na regulação da atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato e de ^{14}C -alanina no fígado de ratos alimentados e em jejum de 24h. Os resultados deste estudo mostram que a hSTC-1 regula o metabolismo do lactato no rim (córtex e medula) de ratos alimentados e em jejum de 48h. Além disso, os dados mostram que a hSTC-1 interfere na sinalização intracelular da via gliconeogênica mediada pelo cAMP no córtex renal.

Abstract

Stanniocalcin (STC) is a glycoprotein hormone found in fish, but also present in mammals. There are two isoforms, STC-1 and STC-2, expressed in different organs, such as liver and kidneys, suggesting an important physiological contribution of STCs to metabolic pathways. During fasting, hepatic glycogen levels decrease and hepatic and renal gluconeogenesis become the main alternatives for maintaining plasma glucose levels. The aim of this study was to evaluate the role of human STC-1 and STC-2 hormones (hSTCs) in glucose and lactate metabolism in the liver and kidney of fed or fasted rats. Specifically in renal lactate metabolism, the aim was to determine the ability of hSTC-1 to modulate the 3', 5'- cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signal in fed rats. **Methods:** Adult male Wistar rats (n = 120) were divided into three groups: 1) fed, which received water and a standard diet for rodents *ad libitum*; 2) fasted for 24 hours for hepatic gluconeogenesis study, and 3) fasted for 48 hours for renal gluconeogenesis study, which received water *ad libitum* and were individually housed. Animals were decapitated and stem blood was collected. The liver and kidneys were excised, sliced and used for *in vitro* experiments. The control groups were incubated without hSTCs hormones. Liver, renal cortex and medulla slices were incubated in Krebs Ringer Bicarbonate (KRB) pH 7.4 and Krebs Ringer Henseleit (KRH) pH 7.4, respectively. Liver slices were incubated in the presence of hSTC-1 and hSTC-2 at 3.86pM and 38.6pM. Also, in the liver tissue, gluconeogenic activity from ¹⁴C-alanine and ¹⁴C-lactate, glucose oxidation, glycogen concentration, and glycogen synthesis from ¹⁴C-glucose of fed and fasting rats (24h) were evaluated. In addition, the hepatic expression of the *Pck1* gene, and the genes

Stc1 and *Stc2*, respectively, were determined. In kidneys, cortex and medulla slices were incubated in the presence of hSTC-1 at 0.386pM; 3.86pM; 386pM and 3860pM. Also, in the renal tissue, the effect of hSTC-1 on gluconeogenic activity from ¹⁴C-lactate, ¹⁴C-lactate oxidation and *Pck1* gene expression were evaluated. The role of hSTC-1 in the stimulatory cAMP signal in renal gluconeogenesis of fed rats was evaluated. Data were expressed as the mean ± standard error of the mean and statistical analysis was performed according to Kolmogorov-Smirnoff normality tests. One- or two-way ANOVA were used to determine the significance of the differences. Gene expression and serological data of lactate metabolism were analyzed by unpaired Student's t-test. Differences were considered significant when P<0.05. The protocols were approved by the official Animal Ethical Committee (#29392) of Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Results: Liver** – In the fed state, only the presence of *Stc1* was detected; after 24-hour fasting, the *Stc1* and *Stc2* genes expression increased significantly (P<0.05). In the fed state, hepatic gluconeogenic capacity from ¹⁴C-alanine decreased with 38.6pM of hSTC-2, but it was accompanied by a reduction in *Pck1* gene expression at 3.86 and 38.6pM. After 24-hour fasting, 38.6pM of hSTC-1 stimulated gluconeogenesis from ¹⁴C-lactate. Likewise, hSTC-2 at 3.86 and 38.6pM increased gluconeogenic activity from ¹⁴C-lactate in the liver of fasted rats. However, the increase in *Pck1* expression occurred only in the presence of 3.86pM hSTC-2 in livers of fasted animals incubated with ¹⁴C-lactate. The hSTC concentrations used in this work did not significantly alter the oxidation capacity of ¹⁴C-glucose, glycogen concentration, and glycogen synthesis from ¹⁴C-glucose in the liver of fed or fasted rats. **Kidney** – Only 3860pM of hSTC-1 increased (P<0.05) the

gluconeogenic capacity from ^{14}C -lactate, as well as the expression ($P<0.05$) of *Pck1* gene in the renal cortex of fed rats. Moreover, oxidation of ^{14}C -lactate in renal cortex of fed rats was stimulated ($P<0.05$) by hSTC-1 at 0.386pM. Nevertheless, the hormone concentrations used in the present study did not modify the gluconeogenic activity and ^{14}C -lactate oxidation in the renal cortex of fasting rats (48h). hSTC-1 did not alter gluconeogenesis or oxidation from ^{14}C -lactate in renal medulla of fed rats. However, 3.86pM of hSTC-1 increased ($P<0.05$) renal gluconeogenic activity from ^{14}C -lactate, but did not increase ($P>0.05$) ^{14}C -lactate oxidation or *Pck1* gene expression in renal medulla of fasting rats (48h). Gluconeogenesis from ^{14}C -lactate increased by 50% ($P<0.05$) when using 25 μM of forskolin (FK) plus 2mM of 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), but 3.86pM of hSTC-1 inhibited ($P<0.05$) this increase in the renal cortex of fed rats. The concentrations of FK plus IBMX and hSTC-1 did not alter ($P>0.05$) gluconeogenesis activity in the renal medulla of fed rats. FK plus IBMX reduced oxidation of ^{14}C -lactate; however, hSTC-1 did not change this parameter in either the cortex or the renal medulla. **Conclusion:** The present study is the first to demonstrate the participation of hSTC-1 and hSTC-2 in the regulation of gluconeogenic activity from ^{14}C -lactate and ^{14}C -alanine in the liver of fed and fasted (24h) rats. The results of this study also reveal that hSTC-1 regulates lactate metabolism in the kidney of fed and 48-hour fasted rats. In addition, the data indicate that hSTC-1 act downstream of the adenylyl cyclase pathway, decreasing the gluconeogenesis activity induced by cAMP intracellular increase or stimulating the phosphodiesterase activity in the renal cortex.

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
<i>Actb</i>	Gene da actina
ATP	Adenosinatrifosfato
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CREB	Proteína de ligação do elemento de resposta a cAMP
CS	Corpúsculos de Stannius
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
FAD	Dinucleotídeo de flavina adenina (oxidado)
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina adenina (reduzido)
FBPase-1	Frutose-1,6-bifosfatase-1
FK	Forskolin
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FOXO-1	Forkhead box protein
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GSK3	Glicogênio-sintase-cinase 3
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hSTC-1	Stanniocalcina humana 1
hSTC-2	Stanniocalcina humana 2
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IMDC-3	Inner medullary collecting duct-3 cell
KRB	Krebs ringer bicarbonato
KRH	Krebs ringer henseleit

MCT	Transportador de monocarboxilato
MD	Malatodesidrogenase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzido)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido)
PC	Piruvatocarboxicinase
<i>Pck1</i>	Gene da PEPCK
PEPCK	Fosfoenolpiruvato-carboxicinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	Piruvatocinase
PKA	Proteína cinase A
Sistema ASC	Sistema de transporte de aminoácidos neutros ASC
Sistema A	Sistema de transporte de aminoácidos neutros A
SOCE	Entrada de cálcio operada por estoque
<i>Stc1</i>	Gene da stanniocalcina-1
<i>Stc2</i>	Gene da stanniocalcina-2
STC	Stanniocalcina
UCP2	Proteína desacopladora 2

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 2: Vias da glicogênese e da glicogenólise no hepatócito.

Figura 3: Via da gliconeogênese no fígado de rato.

Figura 4: Representação esquemática da anatomia do rim e do nefro.

Figura 5: Desenho experimental do estudo.

Figura 6: Concentrações dos hormônios stanniocalcinas utilizadas nos experimentos com fatias de fígado ou com fatias de córtex e medula renal.

Figura 7: Resumo esquemático do artigo 1.

Figura 8: Resumo esquemático do artigo 2.

Figura 9: Resumo esquemático do artigo 2.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Stanniocalcinas	15
1.2 Ações das STC-1 e STC-2 em mamíferos	17
1.3 A homeostase da glicose no fígado	23
1.3.1 Oxidação da glicose no fígado	24
1.3.2 Síntese e degradação do glicogênio no fígado	25
1.3.3 A gliconeogênese no fígado	27
1.4 Metabolismo renal	30
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Considerações éticas	37
3.2 Animais e desenho experimental	37
3.3 Eutanásia, coleta do sangue e dos tecidos	39
3.4 Hormônios e drogas	40
3.5 Procedimentos experimentais <i>in vitro</i>	41
3.6 Incorporação de L-[U- ¹⁴ C]-lactato em ¹⁴ C-glicose no rim	43
3.7 Oxidação de L-[U- ¹⁴ C]-lactato no rim	44
3.8 Expressão dos genes <i>Pck1</i> , <i>Stc1</i> e <i>Stc2</i>	45
3.9 Incorporação de L- [U- ¹⁴ C]-alanina e de L- [U- ¹⁴ C]-lactato em ¹⁴ C-glicose no fígado	46
3.10 Oxidação de [U- ¹⁴ C]-glicose no fígado	47

3.11	Determinação da síntese de ¹⁴ C-glicogênio no fígado.....	47
3.12	Glicogênio tecidual e análises bioquímica.....	48
3.13	Análise estatística.....	49
3.14	Cuidados com o descarte de amostras e de materiais tóxicos..._	51
4	RESULTADOS	52
4.1	Artigo 1.....	50
4.2	Artigo 2.....	58
5	DISCUSSÃO	84
5.1	Efeitos da hSTC-1 sobre o metabolismo do lactato no córtex e na medula renal de ratos alimentados e jejuados por 48h.....	84
5.2	Efeito da hSTC-1 e da hSTC-2 sobre a gliconeogênese hepática em ratos alimentados e em jejum de 24h.....	93
6	CONCLUSÃO	100
7	PERSPECTIVAS	101
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
	ANEXO I - Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Stanniocalcinas

A Stanniocalcina (STC) é um hormônio glicoproteico produzido por um par de glândulas endócrinas adjacentes à superfície ventral dos rins de peixes. Essas glândulas foram primeiramente descobertas em peixes teleósteos pelo anatomista e fisiologista alemão Hermann Friedrich Stannius, em 1839, e denominadas de corpúsculos de Stannius (CS). Nos peixes, o aumento dos níveis plasmáticos de cálcio estimula a síntese e a secreção de STC pelos CS, a qual promove inibição do influxo de cálcio nas brânquias e no intestino, assim como o aumentando na reabsorção de fosfato nos túbulos proximais dos rins, tamponando o excesso de cálcio extracelular (CHANG et al., 2003; LU et al., 1994; WAGNER AND DIMATTIA, 2006).

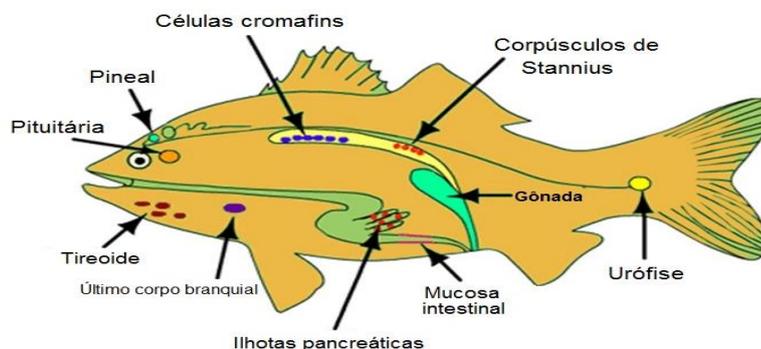


Figura1: Localização do Corpúsculo de Stannius em peixes (WAGNER et al., 1994).

Inicialmente, acreditava-se que nos peixes a síntese de STC estava restrita às células do CS, todavia foi constatado que este hormônio também é expresso, em menor concentração, em outros tecidos, como nos ovários e nos rins (WAGNER AND DIMATTIA, 2006). Estudos posteriores indicaram a presença de padrões de localização subcelular de ligantes para STC em outras

classes de vertebrados tais como anfíbios, aves e mamíferos (WAGNER AND DIMATTIA, 2006). Os CS não estão presentes nessas últimas classes de vertebrados, porém, muitos pesquisadores identificaram a expressão de genes ortólogos ao da *Stc* em diferentes tecidos de mamíferos. O gene que codifica a proteína STC-1 de mamíferos foi identificado e clonado em 1995, o qual foi isolado e identificado em fibroblastos humanos imortalizados-SV40, assim como no sequenciamento de cDNA de pulmão humano (CHANG et al., 1995; OLSEN et al., 1996; YOSHIKO, AUBIN, 2004).

A STC-1 é uma glicoproteína, homodimérica, com aproximadamente 50 kDa, constituída por 247 aminoácidos e possui 61% de homologia em relação à STC de peixes. Sua expressão foi identificada em uma ampla variedade de tecidos de mamíferos como intestinal, ósseo, muscular, neural, renal, pancreático, pulmonar, adiposo, cardíaco, ovariano e prostático (CHANG et al., 1995; McCUDDEN et al., 2002; SAZONOVA et al., 2008). Em 1998, a análise bioinformática de dados no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) possibilitou a identificação de um segundo homólogo da STC-1 em mamíferos denominado de STC-2 (CHANG and REDDEL, 1998). A STC-2 é uma glicoproteína de 302 aminoácidos, possuindo maior presença de resíduos de histidina na região carboxi-terminal, com aproximadamente 34% de homologia em relação a STC-1 (MOORE et al., 1999). A expressão da STC-2 é identificada em diferentes órgãos tais como o coração, o pâncreas, o fígado, os pulmões, os rins, o cérebro e o tecido adiposo marrom (DIMATTIA et al., 1998; SARAPIO et al., 2019).

Nos últimos anos, as pesquisas identificaram aumento na expressão de STC-1 ou de STC-2 em linhagens de células tumorais, assim como em

diferentes tipos de câncer, o qual está associado à proliferação celular, angiogênese e piora no prognóstico, tais como o câncer de mama, o carcinoma hepatocelular, o carcinoma de células escamosas, câncer gástrico e o câncer colorretal (BRANTLEY et al., 2018; CHANG et al., 2003; CHEN et al., 2019). Outras isoformas do hormônio STC, denominadas “big stanniocalcinas”, foram identificadas em células ovarianas de bovinos, possuindo pesos moleculares de 84, 112 e 135 kDa. Normalmente a STC-1 e a STC-2 não são detectadas na corrente sanguínea de mamíferos, porém o hormônio STC-1 atinge limites detectáveis na circulação durante a gestação e a lactação (DEOL et al., 2000; JAMES et al., 2005; JUHANSON et al., 2016). Além disso, é descrito aumento significativo na concentração plasmática de STC-1 e de STC-2 em pacientes com câncer gástrico (FANG et al., 2014).

Com base no padrão de expressão da STC-1 e da STC-2 em diferentes tecidos de mamíferos e os níveis não detectáveis desses hormônios no plasma, com exceções das situações previamente descritas, é consistente que esses hormônios ajam de forma autócrina e/ou parácrina em mamíferos, diferindo da ação endócrina clássica existente nos peixes (DE NIU et al., 2000; ISHIBASHI AND IMAI, 2002; JAMES et al., 2005).

1.2 Ações das STC-1 e STC-2 em mamíferos

O conhecimento sobre as funções fisiológicas da STC-1 originou-se principalmente dos modelos *in vitro*, utilizando rins, útero e ovários. O efeito da STC sobre a regulação do cálcio e do fosfato previamente descrito em peixes também foi identificado em mamíferos, embora nesses últimos o metabolismo do cálcio seja predominantemente regulado pelo paratormônio e pela

calcitonina. Ratos Wistar infundidos com dose de 5 nmol/kg de STC recombinante humana apresentaram redução significativa na eliminação de fosfato na urina. Este achado foi corroborado pela análise da atividade do cotransportador Na^+/Pi da membrana luminal do túbulo proximal, o qual apresentou aumento significativo de 40% na sua atividade após igual tratamento (Wagner et al., 1997). Trabalho *in vitro*, utilizando fatias do duodeno de suínos identificou que a STC-1 diminuiu a absorção de cálcio e aumentou a absorção de fosfato (Madsen et al., 1998). Posteriormente, avaliações da corrente de cálcio por *patch-clamp*, em cardiomiócitos de ratos, revelaram que a STC-1 promoveu diminuição na corrente transmembrana por inibir canais de cálcio do tipo lentos (Sheikh-Hamad et al., 2003). Mais recentemente, foi identificada a participação da STC-2 na regulação de canais de cálcio ativados pela depleção da reserva de cálcio do retículo sarcoplasmático (SOCE) em fibroblastos de camundongos knockouts para STC-2 (ZEIGER et al., 2011).

Para melhor compreender as funções dos hormônios STCs em mamíferos, foram realizados estudos *in vivo* em camundongos que superexpressavam STC-1 ou STC-2. Os animais que superexpressavam STC-1 apresentavam um menor tamanho corporal, menor ganho de peso, crescimento e desenvolvimento osteomuscular alterado em relação aos camundongos selvagens, embora os níveis de hormônio do crescimento e da IGF-I não estivessem alterados. Nestes animais foi constatado nível de fosfato plasmático normal, porém elevado nível de cálcio plasmático atribuído a maior atividade dos osteoclastos (VARGHESE et al., 2002). Em outro estudo, os camundongos que superexpressavam STC-1 no músculo esquelético apresentaram comportamento hiperfágico, maior consumo de oxigênio e de

glicose, além de mitocôndrias com morfologia aumentada em relação aos camundongos controle (FILVAROFF et al., 2002). Na linhagem que superexpressa a STC-2, foi verificado retardo de crescimento e de desenvolvimento (especificamente na formação da sutura cranial), podendo ser letal entre 26 e 34% dos neonatos. Esses camundongos também apresentaram hiperfagia, mas não associada à obesidade. Assim, parece que a STC-2 atua mais como um inibidor do crescimento, promovendo a redução do desenvolvimento intramembranoso e endocondral ósseo e da musculatura esquelética (GAGLIARDI et al., 2005). Os camundongos *knockout* para STC1 não apresentaram alterações no crescimento, no fenótipo ou na atividade muscular em relação aos camundongos selvagens (CHANG et al., 2005). Porém, os camundongos *knockout* para STC-2 possuem aumento significativo dos órgãos abdominais e não apresentam alteração no fenótipo em relação à linhagem selvagem (CHANG et al., 2008).

Os trabalhos em camundongos transgênicos complementaram os estudos realizados em tecidos isolados ou em cultura de células assim como, trouxeram novos conhecimentos em relação aos efeitos da STC-1 e da STC-2 sobre a função mitocondrial e sobre os efeitos destes hormônios no metabolismo intermediário. No mesmo período em que Filvaroff et al., (2002) identificaram mitocôndrias aumentadas no músculo esquelético de camundongos que superexpressavam STC-1, estudo de "*in situ* ligand-binding" em tecido renal e hepático identificou que 90% da STC marcada ligava-se às membranas mitocondriais, principalmente à membrana interna (MCCUDDEN et al., 2002). Sítios de ligação para a STC também foram identificados nas membranas mitocondriais e nas gotas lipídicas de células lúteas (PACIGA et

al., 2003). Esses resultados indicam a participação ou influência da STC na atividade mitocondrial de diferentes células. Embora a STC atue como um ligante de membranas, seu receptor não é conhecido e alguns estudos indicam a participação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e da proteína cinase A (PKA) como elementos relacionados com a via de transdução do sinal (LI et al., 2018; LU et al., 1994; PACIGA et al., 2004; TERRA et al. 2015).

Outro importante achado foi o efeito estimulador da STC-1 sobre a cadeia transportadora de elétrons (MCCUDDEN et al., 2002). Foi avaliado o efeito da STC-1 sobre a atividade da cadeia transportadora de elétrons em membranas mitocondriais, em mitocôndrias intactas e em células da linhagem IMCD-3, confirmando o efeito estimulador da STC-1 sobre a cadeia transportadora de elétrons nas diferentes amostras (ELLARD et al., 2007). Os resultados desse estudo também mostraram que a STC-1 promoveu significativa redução na formação de ATP, embora o consumo de oxigênio tenha sido maior, sugerindo um desacoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a respiração (ELLARD et al., 2007). A hipótese de que a STC-1 seria capaz de promover o desacoplamento mitocondrial foi confirmada por outro estudo ao identificar a diminuição dos níveis de ATP intracelular, aumento significativo na quantidade de proteína desacopladora UCP2, atividade normal dos complexos I-IV da cadeia respiratória e aumento na viabilidade celular em macrófagos de camundongos após incubação com diferentes concentrações de STC-1 (WANG et al., 2009).

O efeito da STC no metabolismo intermediário foi postulado pelo trabalho de MOORE et al., (1999) ao identificar a co-localização da STC-2 ao glucagon nas células alfa de ilhotas pancreáticas humanas. O possível papel

regulador no metabolismo da glicose pela STC foi reforçado no trabalho de ZAIDI et al., (2012) que identificou a co-localização da STC-1 com a insulina nas células beta das ilhotas pancreáticas em camundongos. Com base no efeito desacoplador da STC sobre as mitocôndrias e na diminuição do ATP intracelular ZAIDI et al., (2012) inferiu possível ação reguladora da STC sobre a secreção de insulina e por sua vez na homeostase da glicose. Em humanos, estudo recente indicou correlação significativa entre STC-1, glicemia e hemoglobina glicada em pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), enquanto os pacientes com maior valor de hemoglobina glicada possuíam menor expressão de STC-2 nas plaquetas (LOPEZ et al., 2017). Além disso, ao utilizarem animais *knockout* para STC-2 identificaram mudanças significativas nos níveis de glicose e de glucagon plasmático, indicando possíveis alterações nos mecanismos de síntese ou secreção do glucagon (LOPEZ et al., 2017).

Estudo *in vitro*, avaliando a ação de diferentes concentrações de STC-1 e de STC-2 sobre o metabolismo da glicose no tecido muscular esquelético e hepático, de ratos Wistar, identificou que a STC-1 diminuiu significativamente a oxidação de glicose no fígado e a atividade da enzima piruvatocinase (PK) no músculo esquelético. Entretanto, a STC-1 promoveu aumento da incorporação do ^{14}C da glicose em glicogênio no músculo esquelético assim como, de ^{14}C da glicose em lipídios totais nos tecidos muscular esquelético e hepático. Já a STC-2 promoveu diminuição da oxidação de glicose nos tecidos hepático e muscular, mas aumentou a atividade da enzima PK em ambos os tecidos, quando em baixas concentrações, assim como a síntese de glicogênio a partir de ^{14}C da glicose no músculo. Tanto a STC-1 quanto a STC-2 causaram redução significativa na concentração de ATP no tecido hepático

(GONÇALVES, 2012). Esses resultados indicam que a STC-1 e a STC-2 são capazes de modificar algumas vias de síntese e de geração de energia nos diferentes tecidos, reforçando a participação desses hormônios no metabolismo intermediário.

Os rins desempenham variadas funções na manutenção do meio interno do organismo e dentre essas a gliconeogênese, a qual contribui para a síntese endógena de glicose. SCHEIN et al., (2015) demonstraram que a ação, *in vitro*, da STC-1 diminuiu significativamente a gliconeogênese renal a partir de ¹⁴C-glutamina, ao reduzir a atividade e a expressão da enzima fosfoenolpiruvato-carboxicinase (PEPCK) na medula renal (SCHEIN et al., 2015).

No trabalho realizado por COZER et al., (2016) foi demonstrado que a STC-1 aumentou a síntese de lipídios a partir de ¹⁴C-glicose no tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos Wistar alimentados. No entanto, a STC-1 diminuiu a incorporação do ¹⁴C da glicose em lipídios totais no tecido adiposo marrom de ratos Wistar alimentados, indicando um padrão de resposta hormonal não apenas dependente de concentração, mas também relacionado com as características fisiológicas de cada tecido (COZER et al., 2017). Embora as stanniocalcinas sejam expressas no tecido adiposo marrom de ratos, um notável aumento na expressão de STC-2 foi identificado no tecido adiposo marrom de ratos Wistar submetidos ao jejum. Esse resultado indica a influência do estado metabólico sobre a expressão de STC nos tecidos (SARAPIO et al., 2019).

Estudo recente utilizando camundongos susceptíveis à obesidade identificou que a STC-2 quando injetada intracerebroventricular causou redução na ingestão alimentar. Além disso, ao ser administrada

intraperitonealmente foi capaz de aumentar os níveis de RNA mensageiro (mRNA) do neuropeptídeo pró-opiomelanocortina, regulando, assim, o apetite e o peso corporal desses animais (JIAO et al., 2017). Outra função da STC-2 foi descoberta em estudo utilizando camundongos suscetíveis à esteatose hepática não alcoólica, no qual o uso intraperitoneal de STC-2 resultou na diminuição significativa do acúmulo de lipídios, na glicemia de jejum e na expressão de genes lipogênicos. Esses resultados revelam um relevante papel da STC-2 na regulação do metabolismo de lipídios no fígado (ZHAO et al., 2018).

1.3 A homeostase da glicose no fígado

O fígado é o principal responsável pela homeostase da glicose no organismo, pois ele coordena processos de captação e de armazenamento de glicose (glicogênese), assim como os de produção endógena de glicose por meio da glicogenólise e da gliconeogênese (PETERSEN et al., 2017). O fígado coordena o metabolismo energético do organismo, agindo como um integrador metabólico de vários tecidos como o músculo esquelético, os tecidos adiposos e os rins (RUI, 2014). Após a digestão, no trato gastrointestinal, a glicose, os ácidos graxos e os aminoácidos são absorvidos e transportados pela corrente sanguínea para o fígado através do sistema de circulação das veias portais (AIRES, 2012). A distribuição de glicose no período pós-prandial depende da capacidade da insulina em estimular a captação de glicose em tecidos periféricos como o músculo e os tecidos adiposos. Porém, nos hepatócitos a captação de glicose é mediada pelo transportador de glicose (GLUT 2), ocorrendo de forma facilitada e independente da ação da insulina (RUI, 2014). No estado pós-prandial, a glicose pode ser condensada em glicogênio, convertida em ácidos graxos ou

em aminoácidos. Nos hepatócitos, os ácidos graxos livres são esterificados com glicerol-3-fosfato para gerar o triacilglicerol, o qual é armazenado em gotículas lipídicas nos hepatócitos ou secretados na circulação como partículas de lipoproteína de muito baixa densidade. Os aminoácidos podem ser metabolizados para fornecer energia ou usados para a síntese de proteínas, glicose ou outras moléculas bioativas. No estado de jejum, a glicose é liberada do fígado para a circulação e metabolizada pelo cérebro, músculo esquelético, tecido adiposo e outros tecidos extra-hepáticos (PETERSEN et al., 2017; RUI, 2014).

1.3.1 Oxidação da glicose no fígado

No fígado, a glicose é oxidada até dióxido de carbono por meio de uma série de vias metabólicas como a glicólise no citosol, seguida pelo ciclo do ácido cítrico e a cadeia respiratória mitocondrial transportadora de elétrons. Além disso, outros substratos como o lactato, a alanina, os ácidos graxos podem ser oxidados pelos hepatócitos para gerarem energia. Porém, no período pós-prandial, o fígado não é predominantemente oxidativo, ao contrário do cérebro e do músculo esquelético ativo que consomem a maior parte da glicose circulante (ADEVA-ANDANY et al., 2016). A glicólise produz uma pequena quantidade de ATP, mas a maior parte do ATP é produzido através da fosforilação oxidativa do ADP, uma reação de consumo de oxigênio que ocorre na cadeia respiratória mitocondrial transportadora de elétrons. Na via glicolítica é produzido piruvato a partir de glicose no citosol e uma pequena quantidade de ATP e NADH é gerada (2 mol de ATP e NADH por mol de glicose). O ciclo do ácido cítrico fornece NADH e FADH₂ que são subsequentemente oxidados

em NAD^+ e FAD na membrana mitocondrial interna. Estes fornecem equivalentes redutores (elétrons) que são transportados ao longo dos componentes da cadeia respiratória para alcançar o oxigênio molecular que é reduzido à água. A transferência de equivalentes redutores através dos componentes da cadeia respiratória fornece a energia usada para sintetizar o ATP através da fosforilação oxidativa do ADP, resultando na formação de dióxido de carbono e de água (NELSON & COX, 2013; ADEVA-ANDANY et al., 2016).

1.3.2 Síntese e degradação do glicogênio no fígado

O glicogênio é um polímero de glicose extensivamente ramificado que é utilizado pelos animais como reserva energética e altamente concentrado no fígado. Os músculos esqueléticos contêm maior quantidade de glicogênio em relação ao fígado, mas o consumo deste glicogênio atende somente as demandas do tecido muscular. Porém, o glicogênio hepático é utilizado para manter a homeostase da glicose no organismo e por esse motivo seu metabolismo é regulado principalmente pela insulina e pelo glucagon mas, também pode ser regulado alostericamente por moléculas associadas a via.

No estado alimentado, a glicose captada pelo hepatócito é fosforilada pela enzima glicocinase e convertida em glicose-6-fosfato. Essa glicose se liga ao sítio alostérico da glicogênio-sintase *b*, modificando sua conformação e facilitando a remoção de grupos fosforil, adicionados por proteínas-cinases, pela fosfoproteína-fosfatase 1. Assim, a glicogênio-sintase se torna ativa e capaz de utilizar a glicose para aumentar uma ramificação de glicogênio (NELSON & COX, 2013). Embora a insulina não regule a captação de glicose nos hepatócitos, ela controla a síntese de

glicogênio inibindo a ação de enzimas relacionadas com a glicogenólise como a proteína glicogênio-sintase-cinase 3 (GSK3) que inativa a glicogênio-sintase (KOWALSKI & BRUCE, 2014).

No jejum, a diminuição da glicose plasmática estimula a secreção do glucagon, o qual se liga aos receptores específicos nos hepatócitos, causando aumento dos níveis citosólicos de cAMP com consequente ativação da PKA (PETERSEN et al., 2017). Essa cinase está relacionada com a ativação da enzima glicogênio-fosforilase α , a qual conjuntamente com a enzima de desramificação promove a glicogenólise formando glicose-1-fosfato. A enzima fosfoglicomutase realiza a conversão da glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato, a qual é transformada em glicose pela ação da enzima glicose-6-fosfatase (NELSON & COX, 2013). A regulação alostérica da glicogenólise, ocorre quando a glicose plasmática no hepatócito liga-se ao sítio inibitório da glicogênio-fosforilase α , promovendo uma mudança conformacional da enzima. Devido a essa mudança, a fosfoproteína-fosfatase 1 desfosforila e inativa a glicogênio-fosforilase (RUI, 2014).

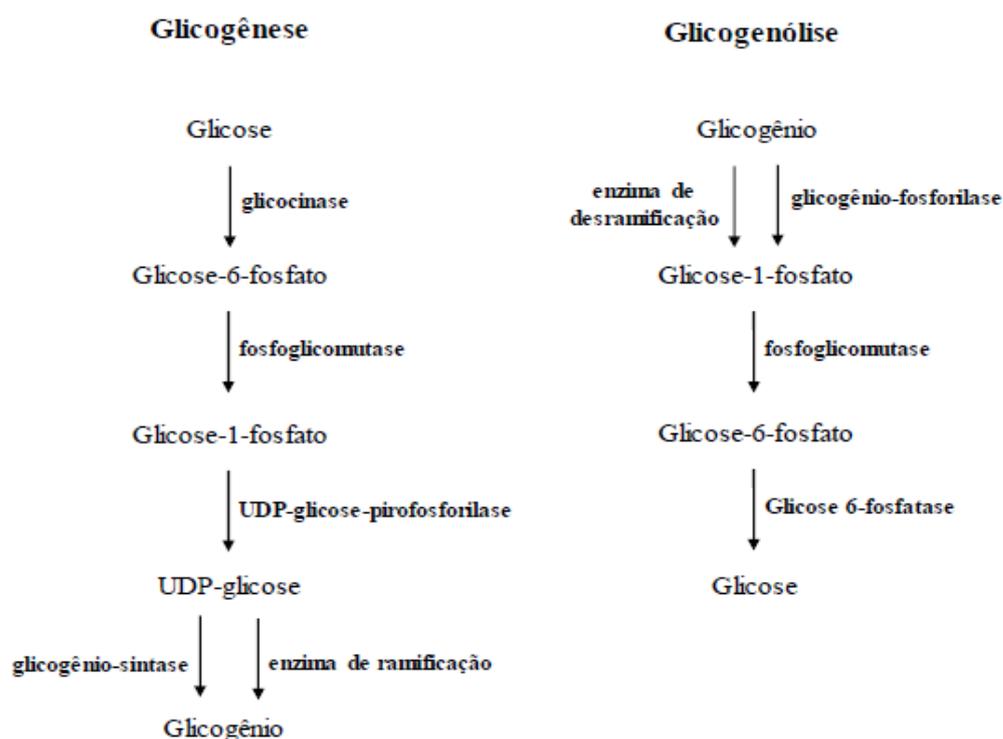


Figura 2: Vias da glicogênese e da glicogenólise no hepatócito. (Adaptado de NELSON & COX, 2014).

1.3.3 A gliconeogênese no fígado

A gliconeogênese hepática é uma importante via na regulação da homeostase da glicose, pois utiliza substratos não glicídicos como lactato, aminoácidos e glicerol para a síntese endógena de glicose. Nos mamíferos, a glicose é o principal substrato energético utilizado pelos tecidos e seus níveis plasmáticos são mantidos em uma faixa relativamente estreita (KANEKO et al., 2018). Quando o glicogênio está esgotado, a gliconeogênese hepática se torna a principal alternativa para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose (ZHANG et al., 2019). No entanto, o aumento anormal da gliconeogênese hepática está associada à alta atividade da PEPCK tanto em humanos quanto em ratos, contribuindo para a hiperglicemia tanto no diabetes 1 quanto no 2 (CRONIGER et al., 2002; RINES et al., 2016).

A PEPCK é a principal enzima da via gliconeogênica que converte o oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, regulando o fluxo através da via gliconeogênica (CRONIGER et al., 2002). Existem duas isoformas da PEPCK em células animais: uma isoforma citosólica, também conhecida como PEPCKc, codificada pelo gene *Pck1* e outra isoforma mitocondrial (PEPCKm) codificada pelo gene *Pck2* (BEALE et al., 2007; GRASMANN et al., 2019). A expressão e a distribuição intracelular das isoformas da PEPCK variam de acordo com as espécies, sendo encontrado 90-95% de PEPCKc expressa nos roedores (CRONIGER et al., 2002).

A alanina é um aminoácido apolar e alifático, que contribui significativamente para gliconeogênese hepática, principalmente durante o jejum. Ela ganha o meio

intracelular dos hepatócitos por meio de transportadores sódio-dependentes conhecidos como sistema A e sistema ASC. Outra importante função da alanina é transportar a amônia oriunda do metabolismo do músculo esquelético para o fígado por meio do ciclo da glicose-alanina (MACDONALD et al., 1976; NELSON & COX, 2013). Nesse ciclo, o grupamento amino é removido do aminoácido e transferido para o α -cetogluturato por meio das enzimas transaminases. Além disso, ocorre o direcionamento do α -cetoácido, o esqueleto de carbono oriundo do aminoácido, para a síntese de glicose por meio da via gliconeogênica. Os α -cetoácidos formados também podem ser utilizados na oxidação (NELSON & COX, 2013).

O L-lactato é um importante precursor gliconeogênico no fígado, sendo transportado através da membrana plasmática pelos transportadores de monocarboxilatos (MCTs). No tecido hepático, as isoformas MCT-1 e MCT-2 são identificadas e associadas à atividade gliconeogênica (HALESTRAP & WILSON, 2012). Estudo realizado em camundongos identificou um aumento significativo na expressão e na concentração de MCT-2 no tecido hepático após 48h de jejum (SCHUTKOWSKI et al., 2014). O lactato pode ser sintetizado a partir da redução do piruvato em vários tecidos e utilizado pelas células em condições aeróbias, não sendo apenas formado em situações de baixas concentrações de oxigênio (BROOKS, 2018). Entretanto, na atividade muscular esquelética intensa, parte do lactato produzido pela glicólise é levada pelo sangue até o fígado, onde é convertida em glicose pela via gliconeogênica (ADEVA-ANDANY et al., 2014). A glicose sintetizada pelo fígado é liberada no sangue podendo retornar para o músculo esquelético, onde é captada e utilizada para a síntese de glicogênio. Essa colaboração entre o tecido muscular esquelético e o fígado é denominado ciclo de Cori.

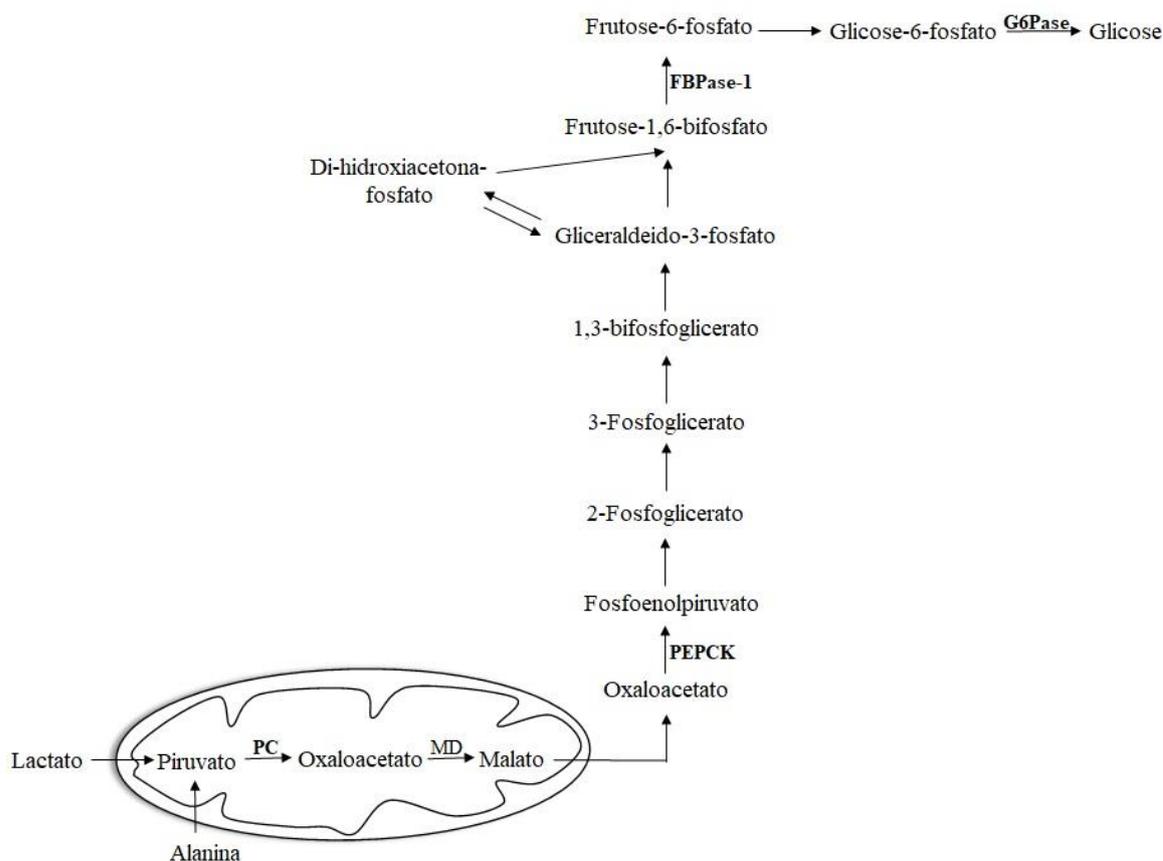


Figura 3: Via da gliconeogênese no fígado de rato. PC (piruvatocarboxicinase); MD (malatodesidrogenase); PEPCK (fosfoenolpiruvato-carboxicinase); FBPase-1 (frutose-1,6-bisfosfatase-1); G6Pase (glicose-6-fosfatase). (Adaptado de NELSON & COX, 2013).

A gliconeogênese hepática é controlada por muitos mecanismos como a ação hormonal, a regulação de enzimas limitantes, os fatores de transcrição, a disponibilidade de substratos. Os baixos níveis de glicose plasmática durante o jejum promovem a secreção de hormônios como o glucagon, as catecolaminas e o cortisol, que evocam distintas ações no metabolismo energético. O glucagon e as catecolaminas estimulam a gliconeogênese hepática por meio do aumento dos níveis de cAMP intracelular e consequente ativação da PKA. Esse processo resulta

na inibição da glicólise, no aumento da expressão de genes gliconeogênicos como *G6pce Pck1* via fatores de transcrição como a proteína de ligação do elemento de resposta a cAMP (CREB) (PETERSEN et al., 2017). Por sua vez, o cortisol também pode aumentar a transcrição de *G6pce Pck1* nos hepatócitos estimulando a síntese de glicose (WANG, 2005). Porém, em tecidos periféricos, como o tecido adiposo branco, esses hormônios promovem a lipólise ao ativarem a lipase sensível a hormônio que converte o triacilglicerol armazenado em ácidos graxos e glicerol. Durante o exercício ou no jejum, o tecido muscular pode converter o piruvato em lactato, o qual é transportado pelo sangue até o fígado. Assim, como no jejum, pode ocorrer a proteólise muscular. Dessa forma, a disponibilização de substratos como o glicerol, o lactato e os aminoácidos podem determinar a velocidade do fluxo e a atividade de enzimas gliconeogênicas (RUI, 2014). As ações da insulina sobre o fígado podem ser descritas como diretas, ao estimularem a glicólise e a glicogênese e indiretas ao contrarregularem as ações do glucagon. Indiretamente a insulina inibe a secreção de glucagon pelas células α do pâncreas, além de impedir a lipólise nos adipócitos. Assim, ela reduz a oxidação de ácidos graxos no fígado e a disponibilidade de substratos, como o glicerol para a via gliconeogênica (KOWALKI & BRUCE, 2014).

1.4 Metabolismo renal

Anatomicamente, o rim pode ser dividido nas zonas cortical e medular (Figura 4). A zona medular é composta por 10 a 18 pirâmides de Malpighi, cujos vértices fazem saliência nos cálices renais e cujas bases e laterais fazem contato com a zona cortical. Essa última é contínua e compreende o espaço entre as bases das pirâmides e a cápsula renal. O néfron constitui a unidade

funcional dos rins, sendo formado pelo corpúsculo renal, o túbulo contorcido proximal, a alça de Henle, o túbulo contorcido distal e o ducto coletor. Conforme disposição dos néfrons nas zonas renais, eles podem ser classificados em corticais, localizados na porção externa e interna do córtex, e justamedulares, localizados na transição entre o córtex e a medula (AIRES, 2012).

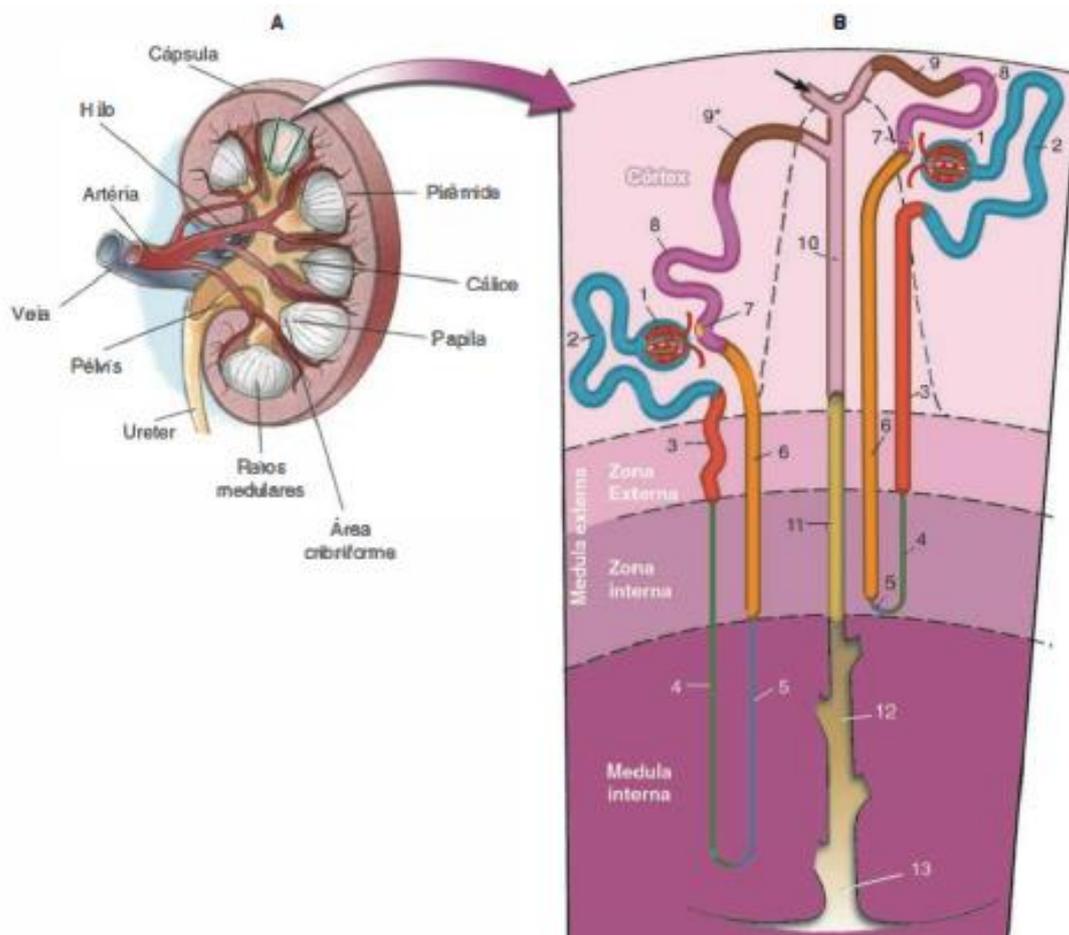


Figura 4: Representação esquemática da anatomia do rim (A) e do nefro (B) humano (AIRES, 2012). 1= glomérulo; 2 = túbulo proximal convoluto; 3 = túbulo proximal reto; 4 = ramo fino descendente da alça de Henle; 5 = ramo fino ascendente da alça de Henle; 6 = ramo grosso ascendente da alça de Henle; 7 = mácula densa; 8 = túbulo distal convoluto; 9 = túbulo de conexão; 9* túbulo de conexão de néfrons justamedular formando uma arcada; 10 = ducto coletor

cortical; 11 = ducto coletor medular externo; 12 = ducto coletor medular interno; 13 = ducto de Belline.

Metabolicamente, o rim pode ser considerado como dois órgãos em separado, pois a utilização da glicose ocorre predominantemente na medula renal e a produção desta hexose ocorre, via gliconeogênese, no córtex renal e medula externa. A reabsorção de glicose e a gliconeogênese são atividades quase exclusivas do túbulo renal proximal, onde a glicose não pode ser metabolizada e a oxidação de ácidos graxos serve como fonte exclusiva de energia celular. Em contraste, a utilização de glicose, ou seja, a síntese e o armazenamento de glicogênio renal, e a oxidação de glicose com formação de lactato (metabolismo anaeróbico), ocorre somente nas células do túbulo distal e na medula renal. Estas diferenças são decorrentes da distribuição diversificada de enzimas nos túbulos renais proximal, distal e na célula da medula renal (CERSOSIMO, 2003).

O córtex renal possui maior fluxo sanguíneo e suprimento de oxigênio que a medula, tanto a externa quanto a interna, a qual adapta o metabolismo de aeróbio para anaeróbio, a fim de suprir a necessidade energética local (BAVEREL et al., 1995). Experimentos *in vitro*, realizados em túbulos contorcidos proximais isolados, de ratos alimentados, indicaram que a glutamina, o lactato e o beta-hidroxibutirato foram os melhores substratos utilizados para manter o conteúdo de ATP intracelular (BAVEREL et al., 1995). Porém, em estruturas como o segmento espesso da alça de Henle, o túbulo contorcido distal e o ducto coletor foi identificada maior contribuição do lactato para a manutenção dos níveis de ATP (BAVEREL et al., 1995).

Além da presença da via gliconeogênica, os rins contribuem significativamente para a homeostase da glicose através de processos como a filtração, a reabsorção, a captação (GERICH, 2009). O túbulo proximal é metabolicamente heterogêneo e contém 3 distintos segmentos (S1, S2 e S3), cujas contribuições individuais para a síntese de glicose sob várias condições experimentais podem ser muito diferentes (MATHER & POLLOCK, 2011; ALSAHLI & GERICH, 2017). Em humanos, foi demonstrado que os três segmentos (S1, S2 e S3) do túbulo proximal podem sintetizar glicose, em concentrações fisiológicas, a partir de lactato e de glutamina. Os segmentos S2 e S3 do túbulo proximal sintetizam mais glicose com a mesma concentração de lactato que o S1 (CONJARD et al., 2001; MATHER & POLLOCK, 2011; ALSAHLI & GERICH, 2017). Em humanos, a gliconeogênese renal é responsável por aproximadamente 20- 25% da produção endógena de glicose no período pós-absortivo. Embora, o fígado colabore com 75-80% da produção endógena de glicose, o percentual referente à gliconeogênese hepática é equivalente ao renal (25-30%) (ALSAHLI & GERICH, 2017). No jejum, a gliconeogênese renal assume importante papel na manutenção da glicemia, podendo contribuir com até 50% da glicose produzida (MEYER et al., 2002; ALSAHLI AND GERICH, 2017).

O primeiro trabalho a descrever a atividade gliconeogênica em fatias de córtex renal de ratos utilizou diferentes substratos energéticos e identificou o lactato e o piruvato como os principais precursores gliconeogênicos, além de relatar uma capacidade de síntese influenciada pela concentração dos substratos (BENOY & ELLIOTT, 1937). Posteriormente, no estudo realizado por KREBS & YOSHIDA (1963) foi avaliada a contribuição da gliconeogênese

renal em diferentes espécies animais, sendo indentificado uma grande atividade em camundongos, ratos, gatos, galinhas e porcos. Dentre os principais precursores utilizados na gliconeogênese renal, nas distintas espécies animais avaliadas, os principais foram o L-lactato, o fumarato e a L-glutamina (KREBS & YOSHIDA, 1963). Em outro trabalho que descreve o efeito das catecolaminas no metabolismo de túbulos renais isolados, de ratos submetidos ao jejum, foi identificado maior capacidade de síntese de glicose a partir de lactato em relação ao glicerol e à glutamina (GUDER & RUPPRECHT, 1975). No período pós-absortivo, o rim apresenta elevada captação de lactato, aproximadamente $160 \mu\text{mol. min}^{-1}$, colaborando com até 30% na remoção sistêmica de lactato (HALL, 2010). Alguns pesquisadores descrevem que a gliconeogênese renal requer a hidrólise de seis moléculas de ATP para converter duas moléculas de lactato em uma de glicose, o que caracterizaria um processo endergônico. Em humanos, o lacatato é capaz de contribuir com aproximadamente 50% no total de glicose produzida através da gliconeogênese renal, enfatizando a importância deste precursor (MEYER et al., 2002; CANO, 2002). Porém, outros estudos realizados em humanos indicam menor contribuição do lactato (16%) para a gliconeogênese renal (CERSOSIMO et al., 2000; WOERLE et al., 2003).

Dentre os aminoácidos, a glutamina é o principal substrato utilizado na gliconeogênese renal, principalmente durante o jejum. Porém, outros aminoácidos como a alanina podem ser utilizados em menor proporção (CANO, 2002). Outra importante característica no uso de glutamina pela via gliconeogênica renal é a produção de 4 ATPs por mol de glicose, resultando em um processo exergônico (KANEKO et al., 2018). Estudo *in vivo*, realizado

em humanos saudáveis, indentificou que a glutamina infundida pode contribuir com até 20% para a síntese renal de glicose (STUMVOLL et al., 1999). Estudos *in vitro*, utilizando túbulos renais isolados ou fatias de rins de ratos, também identificaram contribuição significativa da glutamina para a síntese de glicose tanto no jejum quanto no estado pós-absortivo (GUDER & RUPPRECHT, 1975; SCHEIN et al., 2015). O glicerol também é um importante precursor gliconeogênico renal, contudo seu uso tem destaque no jejum prolongado ou no diabetes, situações em que ocorrem maior lipólise (STUMVOLL et al., 1999).

A concentração de glicose plasmática não é o único elemento que coordena a via gliconeogênica renal, pois esta também é influenciada pelos hormônios os quais exercem uma função reguladora, com efeitos a longo prazo (GERICH, 2010). A insulina controla a via gliconeogênica renal, inibindo a atividade e a expressão gênica de enzimas reguladoras da via, diminuindo a disponibilização de substratos energéticos, causando redução dos níveis de cAMP intracelular e estimulando a captação de glicose. O glucagon embora participe ativamente na regulação da homeostase da glicose em mamíferos não exerce efeito direto sobre a síntese de glicose no rim (ALSAHLI & GERICH, 2017). Entretanto, as catecolaminas estimulam diretamente a gliconeogênese renal através do aumento nos níveis citosólicos de cAMP que por sua vez estimula enzimas reguladoras da via gliconeogênica (ALSAHLI & GERICH, 2017). Outro importante elemento relacionado com a regulação da gliconeogênese é o nível de atividade e de expressão da PEPCK, uma enzima limitante que converte oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, coordenando o fluxo do substrato ao longo da via (BEALE et al., 2007). No trabalho realizado por

SCHEIN et al. (2015) a incubação de fatias de medula renal com hSTC-1 causou redução significativa na atividade e na expressão da PEPCKm resultando em diminuição da gliconeogênese renal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar a hipótese da participação dos hormônios stanniocalcinas na manutenção da homeostase da glicose em ratos alimentados e em jejum. Para isso, foi investigado o envolvimento da hSTC-1 na regulação da gliconeogênese e oxidação de lactato nos rins (córtex e medula) de ratos alimentados e em jejum de 48h. Também o envolvimento da hSTC-1 e da hSTC-2 na regulação da gliconeogênese hepática a partir de alanina e de lactato, na concentração e na síntese de glicogênio a partir de glicose e na oxidação de glicose em ratos alimentados e em jejum de 24h.

2.2 Objetivos específicos

Determinar, *in vitro*, no fígado de ratos alimentados e em jejum (24h) os efeitos da hSTC-1 e hSTC-2 sobre:

- a) a gliconeogênese a partir de L-[U-¹⁴C]-alanina e de L-[U-¹⁴C]-lactato;
- b) a expressão gênica da enzima-chave da gliconeogênese a PEPCKc;
- c) a concentração e a síntese de glicogênio a partir de [U-¹⁴C]-glicose;
- d) a oxidação de [U-¹⁴C]-glicose;
- e) a expressão gênica dos hormônios STC-1 (*Stc1* gene) e STC-2 (*Stc2* gene).

Determinar, *in vitro*, no córtex e na medula renal os efeitos da hSTC-1 sobre:

- a) a modulação do sinal do cAMP intracelular sobre a atividade gliconeogênica e a oxidação de lactato em ratos alimentados;
- b) a atividade da via gliconeogênica a partir de L-[U-¹⁴C]-lactato em ratos alimentados e em jejum (48h);
- c) a expressão gênica da enzima-chave da gliconeogênese, a PEPCKc, em ratos alimentados e em jejum (48h);
- d) a oxidação de L-[U-¹⁴C]-lactato em ratos alimentados e em jejum (48h).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com o protocolo de número 29392 (comprovante disponível no Anexo I). O projeto foi desenvolvido no laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) em conjunto com o laboratório de Fisiologia Celular (Fiscel) e do laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (Labimet) do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Todos os procedimentos desse estudo foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal- CONCEA.

3.2 Animais e desenho experimental

Foram utilizados 120 *Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*, machos, adultos, de 300±50g obtidos do CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de

Animais em Laboratório) do campus do vale – UFRGS, os quais foram alojados no Biotério setorial do Departamento de Farmacologia, do ICBS da UFRGS. Os animais foram alojados em caixas/moradias de polipropileno (410 mm x 340 mm x 160 mm) com grades altas que asseguram altura mínima de 17,8 cm. A área interna de cada gaiola é de 1110 cm², assegurando uma área de 187,05 cm² por animal. Os animais foram mantidos em temperatura controlada de 21°C e ciclo de 12h claro/12h escuro e a umidade mantida entre 40-60% (2 animais por caixa). Foram realizadas três trocas de caixas por semana, com aproximadamente 05 cm de cama de maravalha de *Pinnus* previamente autoclavada. A higienização das caixas, grades, bebedouros e bicos foram realizados com detergente neutro e imersas por 2h em solução de hipoclorito a 10%.

Os animais passaram por um período de 1 semana de aclimação ao biotério (Figura 5) e após aclimatados foram randomicamente divididos em dois grupos: animais alimentados e animais submetidos ao jejum de 24h ou 48h. Os animais alimentados receberam, *ad libitum*, água e dieta padrão comercial para roedores (20% proteína, 55% carboidrato e 4,5% de lipídio; RodentChow, Nutrilab®, São Paulo, Brazil). Os animais jejuados receberam água *ad libitum* e foram alojados individualmente com maior quantidade de maravalha para garantir melhor conforto térmico. Em todos os experimentos, os animais jejuados iniciaram a restrição dietética às 9h da manhã. O monitoramento foi realizado diariamente, possibilitando a identificação de alterações relacionadas à saúde e ao conforto dos animais.

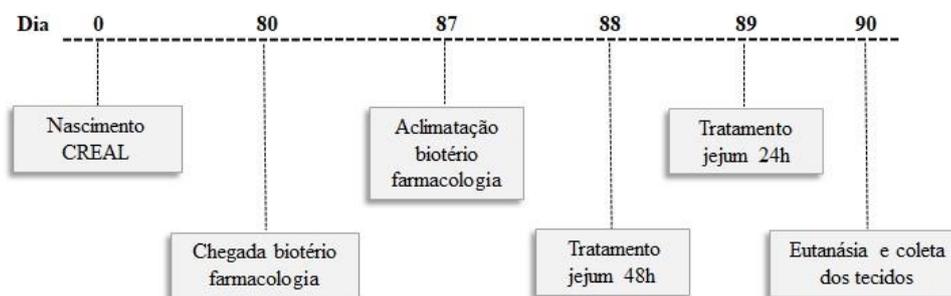


Figura 5: Desenho experimental do estudo. Os animais chegaram ao biotério setorial do Departamento de Farmacologia com 80 dias de idade e foram aclimatados por uma semana. Com 88 dias de idade foi iniciado o jejum 24h dos animais destinados ao estudo da gliconeogênese hepática sendo a eutanásia destes realizada no dia seguinte. Com 88 dias de idade foi iniciado o jejum de 48h dos animais destinados ao estudo da gliconeogênese renal. Assim, esses animais foram eutanasiados com 90 dias de idade.

3.3 Eutanásia, coleta do sangue e dos tecidos

Os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina específica para pequenos animais, sem uso de anestesia. O procedimento de eutanásia foi realizado pelo pesquisador responsável, o qual possui experiência e treinamento para a realização desta atividade. A eutanásia baseia-se no fato de ser um método eficaz que produz um menor estresse aos animais. Considerando a necessidade de obtenção de sangue periférico e a realização de análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetado nos animais por

ocasião da decapitação. Essa forma de eutanásia é utilizada por pesquisadores da área de metabolismo de diversos países e aceita pelas revistas internacionais indexadas e de alto impacto (BROWN et al., 2005; SAHA et al., 2005).

No dia da eutanásia, os animais foram transferidos para uma sala no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada - LaMEC, separada daquela onde ocorreu a decapitação e os experimentos, em ambiente tranquilo, com temperatura controlada e água *ad libitum*. Após a eutanásia de cada animal, a guilhotina foi higienizada e vaselina em pasta foi passada na navalha para conservação do fio. A higienização da bancada foi realizada com sabão neutro. O sangue troncular foi coletado em tubos com ativador de coagulação e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos para separação do soro. As amostras de soro foram congeladas a -80°C até sua utilização. O fígado e os rins foram excisados, dispostos sobre placas de Petry, mantidas sobre gelo e lavados com Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) pH 7,4 ou Krebs Ringer Henseleit (KRH) pH 7,4 gelados, respectivamente, sendo removidas dos rins a gordura perirrenal e a cápsula renal.

3.4 Hormônios e drogas

Os hormônios hSTC-1 e hSTC-2 foram adquiridos a partir de *Recombinant Human* hSTC-1 e hSTC-2 (Ray Biotech Inc. EUA). As análises no tecido renal foram realizadas com diferentes concentrações de hSTC-1 (0,386 pM; 3,86pM; 386pM; 3860pM) igualmente diluídas em KRH (Figura 6). No estudo realizado com tecido hepático foram utilizadas as concentrações 3,86pM e 38,6pM de hSTC-1 e de hSTC-2 diluídas em KRB (Figura 6). As concentrações utilizadas neste estudo são consideradas fisiológicas para roedores (De NIU et al., 2000;

SAZONOVA et al., 2008). Além disso, estudos prévios do nosso laboratório utilizaram as mesmas concentrações de hSTC-1 e de hSTC-2 para demonstrar as ações destes hormônios sobre a gliconeogênese renal e o fluxo de glicose no tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal, assim como no tecido adiposo marrom (SCHEIN et al., 2015; COZER et al., 2016 e 2017; SARAPIO, 2019). Forskolin (FK) e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) foram comprados da Sigma-Aldrich (EUA) e preparados em solução de etanol e água, respectivamente.

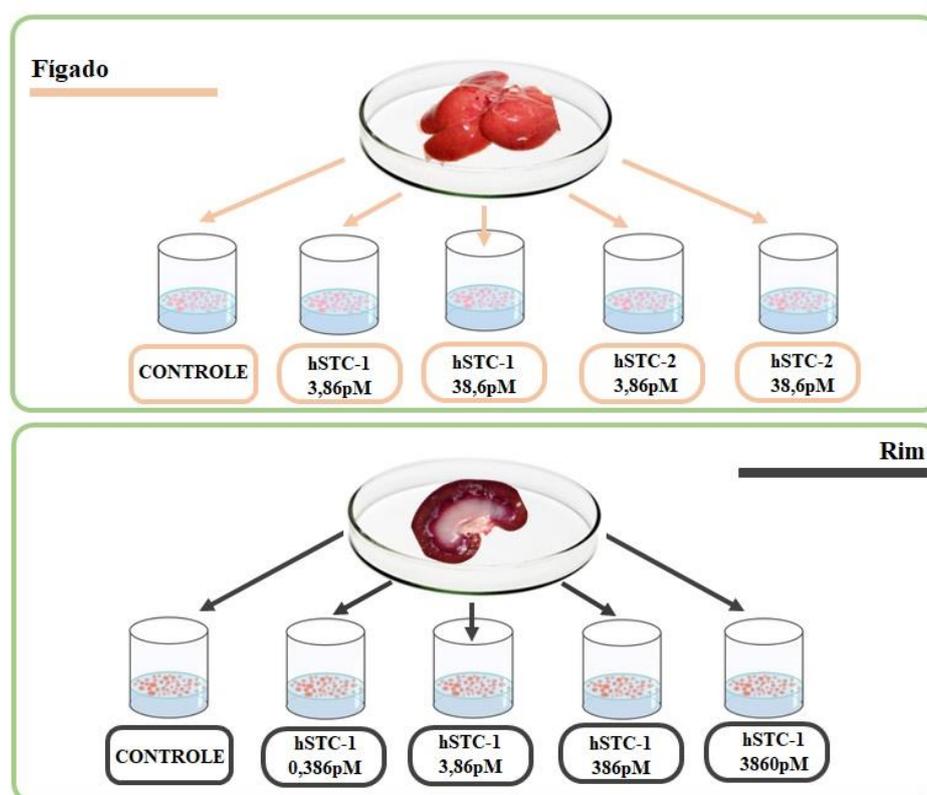


Figura 6: Concentrações dos hormônios stanniocalcinas utilizados nos experimentos com fatias de fígado ou com fatias de córtex e medula renal.

3.5 Procedimentos experimentais *in vitro*

Os rins de ratos alimentados ou em jejum foram fatiados ($90 \pm 10\text{mg}$; 800-1000 μm de espessura) longitudinalmente, segundo técnica descrita por KREBS

et al. (1963) e separado o córtex da medula renal. O fígado também foi fatiado utilizando fatiador manual, sendo obtidas fatias ($100 \pm 10\text{mg}$) $800\text{-}1000\mu\text{m}$ de espessura. Em seguida, as fatias de tecido renal ou hepático ou foram distribuídas em grupo controle (sem hormônio) e grupo experimental (com hormônio). Segundo YEUNG et al. (2012), nos mamíferos as stanniocalcinas exibem funções parácrinas, autócrinas e intrácrinas. Dessa forma, foi escolhido o uso de fatias de tecido para que não fosse comprometida a comunicação entre as células. Após, as fatias de tecido foram pesadas, dispostas em tubos de polietileno contendo 1mL de KRB pH 7,4 para as amostras de fígado ou KRH pH 7,4 para as fatias de rim, aeradas com gás carbogênio ($\text{O}_2\text{:CO}_2$, 95:5%, v/v) por 30 segundos e pré-incubadas por 15 minutos. Ao término da pré-incubação os tecidos foram secados em papel filtro e imediatamente transferidos para novos tubos contendo 1 mL de meio de incubação, na presença ou na ausência dos hormônios hSTC-1 ou hSTC-2. Para o estudo do efeito da hSTC-1 sobre o aumento dos níveis de cAMP intracelular, o córtex e a medula renal foram incubados em presença de diferentes concentrações (20; 25 e $30\mu\text{M}$) de FK (um ativador da adenilil-ciclase) e 3-isobutil-1-metilxantina (IMBX) nas concentrações de 1 e 2mM (um inibidor não específico da enzima fosfodiesterase) que são usados para induzir os efeitos mediados via aumento dos níveis de cAMP intracelular (Alasbahi & Melzig, 2012). Os tubos foram aerados com gás carbogênio ($\text{O}_2\text{:CO}_2$, 95:5%, v/v) por 30 segundos e após incubados durante 60 min na presença ou não das diferentes concentrações de hSTC-1 ou de hSTC-2. Tanto a pré-incubação quanto a incubação foram realizadas a 37°C , sob agitação constante em banho metabólico tipo *Dubnoff*.

3.6 Incorporação de L-[U-¹⁴C]-lactato em ¹⁴C-glicose no rim

Após o período de pré-incubação, as fatias de córtex e medula renal (90 ± 10 mg) foram incubadas nas condições descritas na seção 3.5, na presença de 0,1 µCi de L-[U-¹⁴C]-Lactato (289 mCi / mmol; PerkinElmer) acrescido de 10 mM de L-lactato. Para estudar o efeito do aumento intracelular de cAMP, aos meios de incubação foram adicionados 20, 25 ou 30µM de FK com 2mM de IBMX na presença e na ausência de hSTC-1 na concentração de 3.86pM. O grupo controle era incubado sem FK, IBMX e hSTC-1. Para o estudo do efeito da hSTC-1, aos meios foram acrescentados 0,386; 3,86; 386 ou 3860pM de hormônio. O grupo controle foi incubado sem hSTC-1. Após a adição dos substratos não marcados, o pH do meio de incubação foi determinado. Estudos prévios demonstraram que sob condições experimentais, 5% CO₂ não afeta a capacidade gliconeogênica (SCHEIN et al., 2015). Após o término da incubação, os tubos foram parcialmente imersos em gelo para interromper as reações teciduais. Os tecidos foram removidos e uma amostra de 300µL do meio de incubação foi acrescida de 75µL de Ba(OH)₂ saturado e 75µL de ZnSO₄ a 2% para desproteinização (SOMOGYI, 1945). Após, as amostras foram centrifugadas a 6000g por 10 min e o sobrenadante utilizado para identificar a glicose produzida durante a incubação. Para isso, foi utilizada a técnica de cromatografia de camada delgada em placas de alumínio com sílica gel 60G (Merck) segundo método descrito por SCHEIN et al. (2015). Como solução carreadora foi utilizado da mistura de n-butanol: álcool etílico 95%: ácido acético 5,4% na proporção 500:316:184 (v/v/v). A atmosfera da cuba era previamente saturada com 200 mL de solução carreadora e o espaço disponível para o eluente percorrer a placa era limitado a uma extensão de 6cm

a partir do ponto de origem, onde foram aplicadas as amostras. Na origem foram aplicados 10 μ L de padrão de glicose não marcada (1mg/mL) juntamente com 10 μ L amostra e o controle contendo 20 μ L do padrão de glicose. Após a separação da amostra, as placas de cromatografia eram secadas em capela ventilada, borrifadas com solução reveladora (etanol 95%: ácido sulfúrico concentrado: anisaldeído, na proporção 18:1:1, v/v/v). Em seguida, as placas de cromatografia eram transferidas para a estufa a 100°C, por 10 min, para serem reveladas. Após, a sílica era cuidadosamente raspada das bandas de interesse e transferida para tubos contendo 2mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-100 (2:1); PPO (0,4%); POPOP (0,01%)]. A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac). Os resultados foram expressos em μ mol de L-[U-¹⁴C]-lactato convertida em ¹⁴C-glicose.g⁻¹.min⁻¹.

3.7 Oxidação de L-[U-¹⁴C]-lactato no rim

Após o período de pré-incubação, as fatias de córtex e medula renal foram incubadas sob as condições descritas na seção 3.5, mas na presença 0,1 μ Ci de L-[U-¹⁴C]-Lactato (289 mCi/mmol; PerkinElmer) acrescido de 10 mM de L-lactato, respectivamente. Nas tampas de borracha dos frascos de incubação foram fixados vidros em formato de “J” com um poço onde uma tira de papel *Whatman*TM 3MM foi introduzida e embebida em 1M Hyamine® (0,2 mL) para reter o ¹⁴CO₂ produzido pela oxidação dos substratos. A incubação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% através da tampa de borracha. Os frascos foram vedados com parafilme e permaneceram em capela por 24h. Posteriormente, o papel 3MM foi transferido

para frascos de incubação contendo 2 mL de líquido de cintilação (BUENO et al., 1994). A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallacc) e os valores de produção de $^{14}\text{CO}_2$ foram expressos em mmol de ^{14}C de lactato incorporado em $^{14}\text{CO}_2$. $\text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de incubação.

3.8 Expressão dos genes *Pck1*, *Stc1* e *Stc2*

As amostras de córtex, medula renal e fígado incubadas com STCs foram utilizadas para determinar o efeito deste hormônio sobre a expressão da *Pck1*. Por outro lado, para a determinação da expressão dos genes *Stc1* e *Stc2* as amostras de fígado foram incubadas somente em KRB pH7,4 como descrito na seção 3.5.

O RNA total das fatias dos diferentes tecidos foram extraídos com o reagente Trizol[®] (conforme protocolo do fabricante *Life Technologies*). As amostras de RNA foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro para quantificação de ácidos nucleicos, NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Apureza do RNA foi avaliada utilizando a razão da absorbância A260/A280 entre 1,6 e 2,0 nm. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μg de RNA conforme o kit GoScript Reverse Transcription System (Promega) com volume final de 20 μl . *Primers* específicos foram desenhados para os genes em estudo: *Stc1*, *Stc2*, *Pck1* e *Actb*, usando o programa IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc., USA). A concentração final de primers utilizada com Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) foi de 0,2 μM e o cDNA diluído em 1:10. As reações de PCR em tempo real (qPCR), foram realizadas em triplicata. As condições térmicas do ciclo foram 10s a 95 °C, 20s a 60 °C, 15 s a 95 °C, 15s a

60 °C, 15s a 95 °C e 40 ciclos seguidos de análise da curva de melting em StepOne Real Sistema qPCR (Applied Biosystems). Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa StepOne software versão 2.0. Reações controle foram realizadas para verificar se nenhuma amplificação de material ocorreu nos poços que não continham o cDNA. Os valores de Ct (*Cycle Threshold*) das triplicatas foram utilizados para o cálculo da expressão dos genes estudados, com normalização pelo gene controle endógeno beta actina, usando o método $2^{-\Delta Ct}$ (comparação dos valores de Ct do gene alvo e gene de referência) (LARDIZÁBAL et al., 2012; SVINGEN et al., 2015; LAW et al., 2012; SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

3.9 Incorporação de L-[U-¹⁴C]-alanina e de L-[U-¹⁴C]-lactato em ¹⁴C-glicose no fígado

Após o período de pré-incubação, as fatias de fígado (100 ± 10 mg) foram incubadas nas condições descritas na seção 3.5, porém na presença de 0,1 μ Ci de L-[U-¹⁴C]-alanina (151mCi/mmol; Perkin Elmer) acrescido de 5 mM de L-alanina ou na presença de 0,1 μ Ci de L-[U-¹⁴C]-Lactato (289 mCi / mmol; PerkinElmer) acrescido de 5 mM de L-lactato. Ao término da incubação, os tubos foram parcialmente imersos em gelo para interromper as reações teciduais. As etapas de preparação das amostras, separação da glicose por cromatografia de camada delgada e detecção foram realizadas conforme a descrição na seção 3.6. Os resultados foram expressos em μ mol de L-[U-¹⁴C]-alanina ou L-[U-¹⁴C]-lactato convertido em ¹⁴C-glicose.g⁻¹.min⁻¹.

3.10 Oxidação de [U-¹⁴C]-glicose no fígado

Após o período de pré-incubação, as fatias de fígado foram incubadas sob as condições descritas na seção 3.5, mas na presença de 0,1 µCi de [U-¹⁴C] - Glicose (289 mCi/mmol; PerkinElmer) e 5 mM de glicose. O ensaio foi realizado de acordo com as etapas descritas na seção 3.7 e a radioatividade medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallacc). Os valores de produção de ¹⁴CO₂ foram expressos em mmol de ¹⁴C de glicose incorporada em ¹⁴CO₂. mg⁻¹. h⁻¹ de incubação (BUENO et al., 1994).

3.11 Determinação da síntese de ¹⁴C-glicogênio no fígado

Após o período de pré-incubação, as fatias de fígado foram incubadas sob as condições descritas na seção 3.5, mas na presença de 0,1 µCi de [U-¹⁴C] - glicose (289 mCi/mmol; PerkinElmer) mais 5 mM de glicose. Finalizada a incubação, os tecidos foram lavados com KRB, secados em papel filtro, transferidos para tubos cônicos contendo 200µL de KOH, 0,5 M e fervidos por 60 min. Em seguida, foi adicionado 75µL de solução (HCl 1N + TCA 30%) para neutralizar e desproteínizar as amostras. Após, as amostras foram centrifugadas a 600 g, por 10 min e o sobrenadante coletado. Uma alíquota de 40 µL do sobrenadante foi aplicada sobre recortes de papel *Whatman* 3MM de 2 x 2 cm. Em seguida, os papéis passaram por duas etapas consecutivas de imersão em etanol 66% uma de 30min, seguida por outra de 15min, para promover a adesão do glicogênio ao papel. Por fim, os papéis foram secos em capela e transferidos para frascos de incubação contendo 2mL de líquido de cintilação (THOMAS et al., 1968). A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida

(LKB-Wallacc) e a síntese de glicogênio foi expressa como μmol de ^{14}C -glicose incorporada em glicogênio. mg^{-1} de tecido. min^{-1} .

3.12 Glicogênio tecidual e análises bioquímicas

As fatias de fígado foram incubadas conforme descrito na seção 3.5 e o glicogênio foi extraído segundo o método de VAN HANDEL et al. (1965). Após o período de incubação, o tecido foi colocado em tubos de vidro em presença de 0,5 mL de hidróxido de potássio (KOH) a 1M e incubado a 70°C em banho metabólico por 60 minutos. Após a incubação, foi adicionado 0,01mL de sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 35%. Os tubos foram centrifugados a 420 x g por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em água destilada e etanol a 95% e centrifugado novamente. Para hidrólise do glicogênio em glicose livre, foram adicionados 0,1 mL de água destilada e 0,1 mL de HCL 4M. As amostras foram novamente mantidas em banho metabólico por 60 minutos e, após, neutralizadas com 0,1 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2M. Após a hidrólise ácida e neutralização, os equivalentes de glicose foram medidos com kit comercial colorimétrico para dosagem de glicose da Labtest®. Os resultados foram expressos como mg de glicogênio. g de tecido $^{-1}$.

A glicose e o lactato do soro foram determinados por meio de kits comerciais (Labtest®) conforme protocolo do fabricante. Todas as amostras foram realizadas em duplicata e medidas em espectrofotômetro a 505 ou 550 nm respectivamente. Os resultados foram expressos em mmol.L^{-1} .

3.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. A normalidade dos dados foi determinada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação entre tratamentos distintos foi utilizada a análise de variância de duas vias acompanhadas pelo teste de Dunnett ou Bonferroni. A comparação entre grupos de tratamento semelhante foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett ou Tukey. Para a comparação entre tratamentos distintos foi utilizada a análise de variância de duas vias acompanhadas pelo teste de Dunnett ou Bonferroni. Para dados não pareados foi utilizado Teste t de Student. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prism versão 6.0 (GraphPadPrism Software).

3.14 Cuidados com o descarte de amostras e de materiais tóxicos

Os ensaios foram realizados com o uso dos equipamentos de proteção individual: avental, luva de látex, óculos e máscara quando necessário. O descarte de amostras, bem como de materiais tóxicos e contaminantes foram realizadas de acordo com as normas da UFRGS. As carcaças dos animais mortos foram colocadas em sacos plásticos brancos, identificados e encaminhados ao biotério setorial no ICBS - UFRGS, onde foram recolhidos por empresa terceirizada, responsável pelo serviço de coleta de materiais biológicos de descarte. Materiais tóxicos foram usados em capela de exaustão e os descartes encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação. Os resíduos dos traçadores marcados com ^{14}C foram descartados segundo as normas da

Comissão Nacional de Energia Nuclear, norma NN 8.01 - resolução 167/14 (CNEN - 2014).

4 RESULTADOS

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

4.1 Artigo 1(aceito para publicação)

Effects of stanniocalcin 1 hormone on lactate metabolism in rat kidney under fed and fasted conditions. Life Sciences.<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117922>



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Effects of stanniocalcin 1 hormone on lactate metabolism in rat kidney under fed and fasted conditions



Samir Khal De Souza^{*}, Elaine Sarapio, Everton Lopes Vogt, Vanessa Schein, Rafael Bandeira Fabres, Jorge Felipe Argenta Model, Vitória Girelli, Debora Santos Rocha, Roselis Silveira Martins Da Silva

Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

A B S T R A C T

To test the hypothesis of STC-1 participation in maintenance of glucose homeostasis in fed and fasting (48 h) rats, we investigated that this hormone may be implicated in the regulation of renal gluconeogenesis pathway from lactate and lactate oxidation in renal cortex and medulla. Our results demonstrate the hSTC-1 role on lactate metabolism in the renal cortex and medulla from fed and fasting rats. hSTC-1 increased the gluconeogenesis activity in fed state in renal cortex, and this increase was induced by raise in *Pck1* gene expression. In fasting animals hSTC-1 increase the renal medulla gluconeogenesis activity, but *Pck1* gene expression was not alter. The stimulatory effect of hSTC-1 on ¹⁴C-lactate oxidation occurred only in the renal cortex from fed rats. These findings show the hSTC-1 contribution to lactate homeostasis and supplies glucose to other tissues. This response may represent a strategy of action of STC-1 in response to fasting stress as postulated by different authors. On the other hand, hSTC-1 acts downstream of adenylyclase pathway, decreasing the gluconeogenesis activity induced by cAMP intracellular increase or stimulating the phosphodiesterase activity in the renal cortex. However, no hSTC-1 effect on ¹⁴C-lactate oxidation was found after increase in the intracellular cAMP. The findings also revealed that the renal cortex and medulla respond differently to hSTC-1, possibly due to the higher level of STC-1 gene expression in inner renal medulla than in renal cortex.

1. Introduction

Kidney contributes to glucose homeostasis through gluconeogenesis processes, glucose filtration, reabsorption and consumption, and the proximal tubule is the only nephron segment that contains the key gluconeogenic enzymes [1]. The proximal tubule is metabolically heterogeneous, and contain three distinct proximal nephron segments (S1, S2 and S3) whose individual contributions to glucose synthesis under various experimental conditions may be very different [2]. In human, the S2 and S3 segments synthesize more glucose from the same concentration of lactate than does S1 [1,2]. Lactate, glutamine and glycerol are the main renal gluconeogenic precursors in humans. Kidney and liver differ in their use of these precursors: lactate is the main precursor in both organs and glutamine is used, preferentially by kidney and alanine by liver [3]. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) is an important enzyme that converts oxaloacetate to phosphoenolpyruvate, regulating the gluconeogenesis pathway [4]. The hormonal control of renal gluconeogenesis in mammals is largely accomplished by insulin and catecholamine's [1,5]. Recently, Schein et al. [6] demonstrated in rat renal medulla that human stanniocalcin 1 (hSTC-1) decrease the gluconeogenesis activity from ¹⁴C-glutamine, *Pck2* gene expression and

PEPCK activity.

Stanniocalcin (STC) was first isolated in fish where it regulates calcium and phosphate homeostasis [7,8]. In mammals, STC1 is expressed in a wide range of tissues such as liver, kidneys, heart, lung, stomach, pancreas, brown and white adipose tissues [9–14]. The data indicate that in mammals the effect of STC-1 on target cells is consistent with paracrine and/or autocrine actions [11,15]. Recently, Terra et al. [16] demonstrated that hSTC1 inhibits the forskolin stimulated cAMP accumulation in human embryonic kidney cell lineage (HEK293 cells), suggesting that this hormone may modulates the signals transduction through the cyclic AMP pathway. In the sea bass *Dicentrarchus labrax*, the fish STC-1 A and B controls glucose synthesis via renal gluconeogenesis: the STC-1A increased the glucose synthesis from ¹⁴C-glutamine; and STC-1B decreased the gluconeogenesis activity when the precursor was ¹⁴C-lactate [6]. Newly, the role of STC-1 on hepatic gluconeogenic pathway was demonstrated in liver of teleost fish, suggesting a degree of conservation of STC-1 function on glucose metabolism from fish to mammals [17].

Fasting (48 h) is a stressful situation for rats and metabolic strategies are triggered to maintain glucose homeostasis, and participation of STC-1 in stress cellular responses was postulated [11]. Thus, to test the

^{*} Corresponding author at: Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, CEP: 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: 00150665@ufrgs.br (S.K. De Souza).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117922>

Received 4 January 2020; Received in revised form 4 June 2020; Accepted 5 June 2020

Available online 06 June 2020

0024-3205/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

hypothesis of STC-1 participation in maintenance of glucose homeostasis in fed and fasting (48 h) rats, we hypothesized that this hormone may be implicated in the regulation of renal gluconeogenesis pathway from lactate and lactate oxidation in renal cortex and medulla. Here we presumed that, recombinant hSTC-1 may be involved in: (i) modulation of cAMP stimulation signal on renal gluconeogenesis activity in fed rats; (ii) renal gluconeogenesis from ^{14}C -lactate in fed and fasting rats; (iii) gene expression of key gluconeogenic enzyme PEPCKc in renal cortex and medulla from fed and fasting rats; (iv) ^{14}C -lactate oxidation in the renal cortex and medulla from fed and fasting rats.

2. Material and methods

2.1. Animals

Experiments were carried out in adult male Wistar rats, weighing 300 ± 50 g. The rats were housed in cages with 2–3 animals per cage and kept at 22 ± 2 °C with a regular light/dark cycle of 12 h/12 h. All animals were acclimatized in the animal care facility for at least two weeks before the experiments and randomly divided into fed and fasted groups. Fed rats received standard rodent diet (20% protein, 55% carbohydrate and 4.5% lipids, Nutrilab® Brazil) and water ad libitum. Fasted rats were housed in individual cages with a greater amount of wood shavings to improve thermal comfort, and fasted for 48 h with access to water ad libitum. All experiments were performed at 08:00–10:00 a.m. to minimize the circadian rhythm effect. The protocols were approved by the official animal ethical committee (#29392) of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

2.2. Hormones

Recombinant human STC1 (hSTC1) was purchased from Ray Biotech Inc. (USA). The hSTC-1 concentrations used in this study were 0.386; 3.86; 38.6; 386 pM, as previously used in studies from our laboratory to demonstrate the effects of these hormones on glucose flux in rat white and brown adipose tissues [13,14,18,19].

2.3. In vitro experiments

Fed and fasting (48 h) rats were euthanized and the kidneys were immediately excised and placed on ice Petri dishes with cold Krebs-Henseleit Buffer (KHB) pH 7.4. The renal capsule was removed and kidneys were immediately sliced with manual slicer, according to the methodology developed by Krebs et al. [20]. Slices of kidney (90 ± 10 mg; 800–1000 μm thick) from fed or fasting rats were obtained and renal cortex (CX) and medulla (MD) were separated. In the renal medulla, the outer and inner medulla regions were maintained intact, gluconeogenesis is highest in segment 3 (S3) of the proximal straight tubule [21], which descends toward the renal medulla, in a perpendicular to the cortical surface of the kidney. In mammals, STC-1 exhibit paracrine, autocrine, and intracrine functions [11]. Thus, we chose to slice the kidney, because cellular isolation would compromise the communication between cells. In all experiments, the slices were pre-incubated for 15 min without hormones in sealed flasks with 1 mL KHB buffer pH 7.4, equilibrated with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v). Following the pre-incubation period, CX and MD slices were removed from the medium, dried and incubated for 60 min in sealed flasks containing 1 mL of KHB pH 7.4 with 1% bovine albumin (BSA) and 1% phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), equilibrated with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v) in the absence or presence of different concentrations of hSTC-1 hormone and/or 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.), a non-specific phosphodiesterase inhibitor used to induce cAMP mediated effects, plus forskolin (FK, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.), an adenylatecyclase activator without receptor mediation. Pre-incubation and incubation were performed in the Dubnoff metabolic incubator under constant shaking

at 37 °C. The radioactivity measurement was performed in an LKB-Wallac liquid scintillation spectrometer.

2.4. Gluconeogenesis assay

Following pre-incubation, renal slices (90 ± 10 mg) were incubated under the conditions described in Section 2.3, but in the presence of 0.10 μCi of L-[U- ^{14}C]-lactate (154 mCi/mmol; Perkin Elmer) plus 10 mM unlabeled L-lactate. For the study of effect of the cAMP intracellular increase, to the media were added 20, 25 or 30 μM of FK and 1 or 2 mM of IBMX with or without hSTC-1 at 3.86 pM. The control group was incubated without FK, IBMX and hSTC-1. For the study of effect of hSTC-1, to the media were added 0.386, 3.86, 38.6 or 386 pM of hormone, the control group without hormone. After addition of the unlabeled substrates, the pH of the incubation medium was determined. Previous studies showed that under experimental conditions, 5% CO_2 did not affect gluconeogenesis capacity [6]. At the end of incubation, the medium was deproteinized and ^{14}C -glucose formed from L-[U- ^{14}C]-lactate was separated by thin-layer chromatography using: n-butanol 95%; ethyl alcohol 5.4%; acetic acid in water (75:47.4:27.6, v/v/v). The spot corresponding to ^{14}C -glucose, localized by spraying with an anisaldehyde reagent (95% ethyl alcohol/concentrated sulfuric acid/p-methoxybenzaldehyde 18:1:1, v/v/v) was marked, scraped off and dissolved in scintillation liquid (SLC): toluene:triton X-100 (2:1, v/v)-PPO 0.4%, POPOP 0.01% [6]. The values of gluconeogenesis activity are given as μmol of ^{14}C -lactate converted to ^{14}C -glucose.g $^{-1}$ of tissue.min $^{-1}$.

2.5. Conversion of L-[U- ^{14}C]-lactate to $^{14}\text{CO}_2$

After pre-incubation, renal slices (90 ± 10 mg) were incubated under the conditions described in Section 2.3, but in the presence of 0.10 μCi of [U- ^{14}C]-lactate (154 mCi/mmol; Perkin Elmer) plus 10 mM unlabeled lactate. For the study of effect of the cAMP intracellular increase, to the media were added 20, 25 or 30 μM of FK and 1 or 2 mM of IBMX with or without hSTC-1 at 3.86 pM. The control group was incubated without FK, IBMX and hSTC-1. However, for the study of effect of hSTC-1, to the media were added 0.386, 3.86, 38.6 or 386 pM of hormones, the control group without hormone. The flasks contained small glass wells inside that were attached to the rubber caps and above the level of the incubation medium, containing small strips of Whatman 3MM paper and 1 M Hyamine® hydroxide (0.2 mL) to trap the $^{14}\text{CO}_2$ produced. Incubation was stopped by adding 0.5 mL of 50% trichloroacetic acid through the rubber cap [22]. Subsequently, the glass wells were transferred to vials containing 2 mL SLC. Values of $^{14}\text{CO}_2$ production are expressed as mmol of ^{14}C lactate converted to $^{14}\text{CO}_2$.mg $^{-1}$ of tissue. h $^{-1}$.

2.6. RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR

Following pre-incubation, renal slices (90 ± 10 mg) were incubated under the conditions described in Section 2.3, mRNA analysis of renal cortex or medulla slices were homogenized in Trizol® Reagent (Invitrogen). RNA was extracted using the chloroform-isopropanol method according to the manufacturer's instructions. 1 μg RNA was reverse-transcribed using the GoScript Reverse Transcription System (Promega) in a total volume of 20 μl . Gene-specific primers were mixed with Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) to a final concentration of 0.2 μM . cDNA was diluted 1:10, and aliquots were run in triplicate allowed kit. Thermal cycling conditions were 10 s at 95 °C, 20 s at 60 °C, 15 s at 95 °C, 15 s at 60 °C, 15 s at 95 °C and 40 cycles followed by melting curve analysis on a StepOne Real-Time qPCR system (Applied Biosystems). The ΔC_t method ($2^{-\Delta\text{C}_t}$) was used to calculate relative changes in mRNA abundance, i.e., Ct values for actin beta rRNA were subtracted from the Ct value of Pck1 to adjust for variability in cDNA synthesis. Primer sequences were:

Primers	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>Pck1</i>	TCTGATCCAGACCTTCCAAAAG	CAAACTTCCTCACTTCTCTGG
<i>Actb</i>	ATTGCTGACAGGATGCGAGAA	TAGAGCCACCAATCCACACAG

Briefly, 1 mg RNA was run in 1% agarose gel with bleach (SYBR Safe) at 100 mV for 30 min and detected under UV light. Three sharp bands representing ribosomal RNA (with no smearing) confirmed that the RNA samples were not degraded [23–25].

2.7. Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean and after verified for normality (Kolmogorov Smirnov test). Two-way analysis of variance with the Tukey or Dunnett post-hoc test was used for pairwise comparison concentration curves, fed and fasted states. Statistical differences in gluconeogenesis and oxidation in the presence of FK plus IBMX and 3.86 pM hSTC-1 were evaluated using One-way analysis of variance with the Tukey post-hoc test. Unpaired Student's *t*-test was used to compare differences in mRNA of *Pck1* expression and serum data. All tests and comparisons with $P < 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Prism Plot version 6.0 (GraphPad Prism Software) for windows.

3. Results

FK at 20, 25 and 30 μ M plus 1 mM of IBMX did not affected gluconeogenesis activity in renal CX from fed rats (Fig. 1 A). However, the gluconeogenesis activity in fed rats renal CX increased by 50% at 25 μ M of FK plus 2 mM of IBMX. (Fig. 1 A). In renal MD from fed animals only 30 μ M of FK plus 2 mM of IBMX decreased markedly (41%) ($P < 0.05$) the gluconeogenesis activity (Fig. 1 B). The others concentration of FK and IBMX did not alter significantly the gluconeogenesis activity in the renal MD from fed rats (Fig. 1 B).

Gluconeogenesis activity in renal CX from fed rats was not affect by 3.86pM of hSTC-1, but increase ($P < 0.05$) in presence of 25 μ M of FK plus 2 mM of IBMX; however, the addition of 3.86pM of hSTC-1 decreased by 25% ($P < 0.05$) the gluconeogenesis activity in renal CX when compared to FK/IBMX group (Fig. 2 A). On the other hand, the gluconeogenesis activity in the renal MD from fed rats was not affect by hSTC-1 at 3.86pM or 25 μ M of FK plus 2 mM of IBMX (Fig. 2 B).

In renal CX and MD from fed rats the conversion of 14 C-L-lactate to 14 CO₂ was not affected by 3.86pM of hSTC-1, but 25 μ M of FK plus 2 mM of IBMX decreased by 30% ($P < 0.05$) and 29% ($P < 0.05$), respectively, the 14 C-L-lactate oxidation (Fig. 3 A and B). hSTC-1 did not alter ($P > 0.05$) the FK/IBMX effect on 14 C-L-lactate oxidation in the renal CX and MD from fed rats (Fig. 3 A and B).

The incubation of renal CX from fed rats in presence of graded (0.386–3860pM) concentrations of hSTC-1 increased ($P < 0.05$) the gluconeogenesis activity from 14 C-L-lactate only at 3860pM of hormone (Fig. 4 A). Fasting for 48 h did not alter the gluconeogenesis activity in renal CX (Fig. 4 A). On the other hand, in the renal CX from fasting rats the hSTC-1 at the concentration used in this study did not alter the 14 C-glucose synthesis from 14 C-L-lactate (Fig. 4 A). The PEPCKc mRNA levels in renal CX from fed rats incubated in presence of 3860pM of hSTC-1 increased ($P < 0.05$) when compared to control group (Fig. 4 C).

The incubation of renal MD from fed rats in presence 0.386–3860pM of hSTC-1 did not alter ($P > 0.05$) the gluconeogenesis activity (Fig. 4 B). Fasting for 48 h decreased ($P < 0.05$) the gluconeogenesis capacity in renal MD. hSTC-1 at 3.86pM increased by 29% the gluconeogenesis capacity in renal MD from fasting rats (Fig. 4 B). In contrast, the *Pck1* gene expression in renal MD from fasting rats was not modified by 3.86pM of hSTC-1 when compared to control group (Fig. 4 C).

The incubation of renal CX from fed rats in presence of graded (0.386–3860pM) concentrations of hSTC-1 increased ($P < 0.05$) the

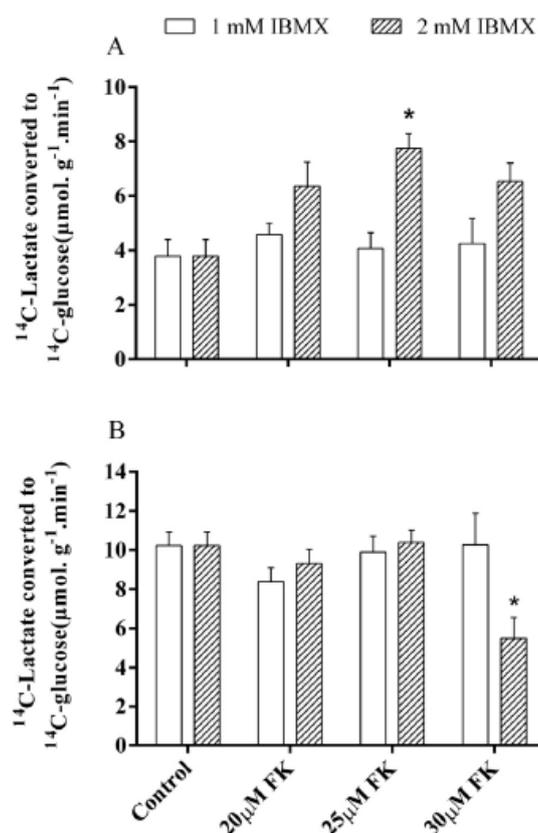


Fig. 1. Effects of different IBMX and FK concentrations on renal gluconeogenesis from 14 C-lactate in the cortex (A) and medulla (B) of fed rats. The bars represent means \pm SEM, control group $n = 8$, treated groups $n = 6$. * $P < 0.05$ vs. control group. IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; FK, forskolin.

14 C-L-lactate oxidation only at 0.386pM of hormone (Fig. 5 A). Fasting for 48 h decreased ($P < 0.05$) the 14 C-L-lactate oxidation in renal CX (Fig. 5 A). The incubation of renal MD from fed and fasting (48 h) rats in presence 0.386–3860pM of hSTC-1 did not alter ($P > 0.05$) the 14 C-L-lactate oxidation (Fig. 5 B).

4. Discussion

In mammals, catecholamines, glucocorticoids, parathyroid hormone, among other hormones, increase renal gluconeogenesis through cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB), which stimulate renal gluconeogenic enzymes and indirectly increase the availability of precursors and stimulators for this metabolic pathway [3,26,27]. FK at 25 μ M plus IBMX 2 mM in the incubation medium increased the glucose synthesis only in renal CX, confirming the mediation of cAMP on stimulation of these pathways in fed rats [2,3,27]. Nevertheless, in the renal CX, addition of hSTC-1 (3.86pM) to the incubation medium decreased the gluconeogenesis activity produced by the increase of cAMP induced by FK plus IBMX. Our results were similar to found by Luo et al. [28] in cultured rat granulosa cells obtained from early antral follicles, which human chorionic gonadotropin (hCG) stimulation of cAMP production was suppressed by 30% when cells were pretreated with FSH plus STC-1 as compared with only FSH pretreatment. In addition, these authors demonstrated that STC-1 acts downstream of adenylyclases pathway in suppressing progesterone biosynthesis in cultured rat granulosa cells [28]. Recently, Terra et al. [16] demonstrated, in vitro, in HEK293 cells that STC-1 inhibited cAMP accumulation induced by forskolin. In this study, hSTC-1 was incubated

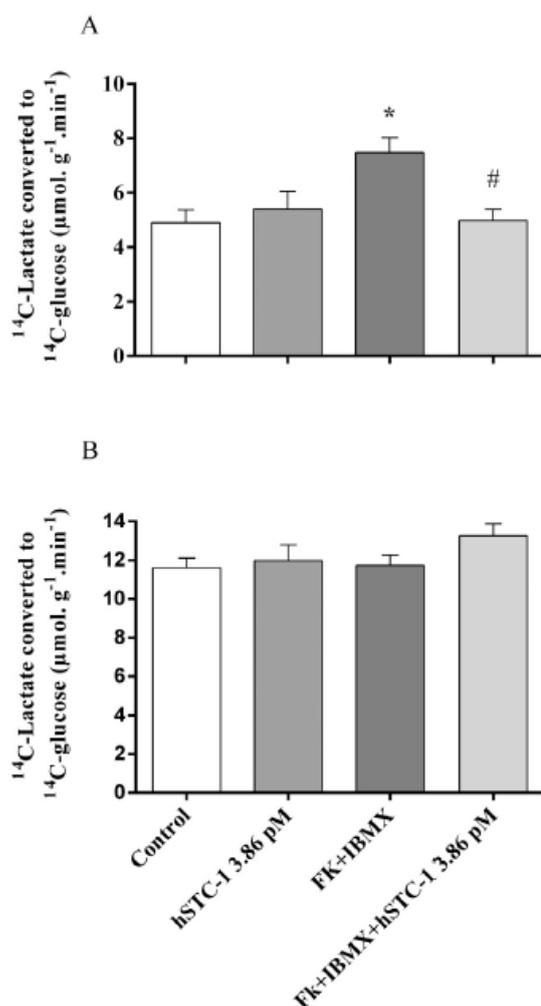


Fig. 2. Effects of 2mM of IBMX and 25 μM of FK plus 3.86pM of hSTC-1 on renal gluconeogenesis from ^{14}C -lactate in the cortex (A) and medulla (B) of fed rats. The bars represent means \pm SEM, control group $n = 11$, treated groups $n = 11$. * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. control FK + IBMX. IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; FK, forskolin; hSTC-1, human stanniocalcin-1.

together with FK and IBMX, as suggested by Terra et al. [16] this hormone prevented the increase in cAMP intracellular concentration, maintaining gluconeogenesis activity in renal CX similar to control group. The binding of hSTC-1 to the specific receptor on renal CX controls intracellular cAMP concentration, thereby regulating the downstream of adenylyclases pathway or increased the phosphodiesterase activity. Elucidation of these points requires further molecular and biochemical studies on the influence of hSTC-1 on the control of adenylyl cyclase downstream pathway and phosphodiesterase activity and gene expression. On the other hand, in renal MD from fed rats, both intracellular increase of the cAMP levels induced by FK plus IBMX and hSTC-1 (3.86pM) did not affect the gluconeogenesis activity from ^{14}C -lactate. The S3 segment of proximal tubule is localized in the outer renal MD, and in rat nephron the glucose synthesis from different precursors decrease progressively from the S1 to the S2 and the S3 segments and it seems to be less sensitive to cAMP intracellular increase or the control is done by another way such as calcium [29]. Nevertheless, this finding was in accordance with the results found by Schein et al. [6] that showed no effect of hSTC-1 (3.38pM) on gluconeogenesis capacity from ^{14}C -lactate in renal MD from fed rats. In contrast, when

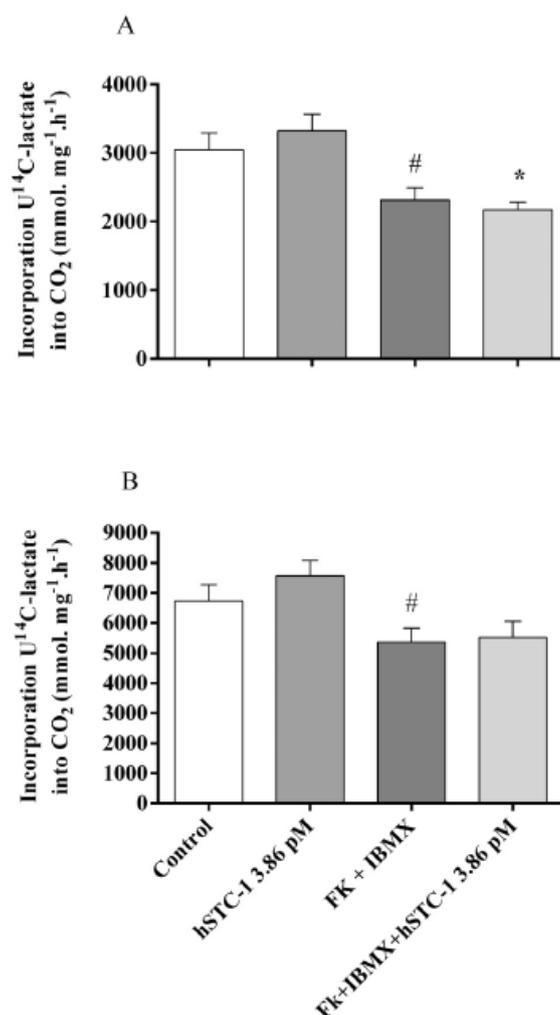


Fig. 3. Effects of 2mM of IBMX and 25 μM of FK plus 3.86pM of hSTC-1 on renal ^{14}C -lactate oxidation in the cortex (A) and medulla (B) of fed rats. The bars represent means \pm SEM, control group $n = 7$, treated groups $n = 5$. * $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. hSTC-1 group. IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; FK, forskolin; hSTC-1, human stanniocalcin-1.

30 μM of FK plus 2 mM of IBMX were added to the incubation medium the gluconeogenesis activity from ^{14}C -lactate in the renal MD from fed rats decreased by 50%. In the isolated human proximal tubules, high concentration of cAMP (1000 μM) decreased significantly the gluconeogenesis activity from ^{14}C -lactate when compared to 10 and 100 μM of cAMP [2].

On the other hand, FK plus IBMX at concentrations used in this study decreased by 30% the ^{14}C -lactate oxidation in both renal CX and MD, and hSTC-1 at 3.86pM did not revert this result. Our results demonstrate that increase in intracellular cAMP stimulates the incorporation of ^{14}C -lactate into ^{14}C -glucose in renal CX from fed rats. Thereby a ^{14}C -lactate bypass to gluconeogenesis pathway decreased its oxidation capacity. Moreover, proximal tubules require large amounts of ATP to drive ion transport and depend on aerobic respiration. These rats were fed and it is known that the fatty acids are a main source of energy for proximal tubules, because more ATP can be produced from one molecule of palmitate than from one molecule of glucose or L-lactate [30]. Although at 0.386 pM hSTC-1 increased the ^{14}C -lactate oxidation in renal CX from fed rats without cAMP intracellular

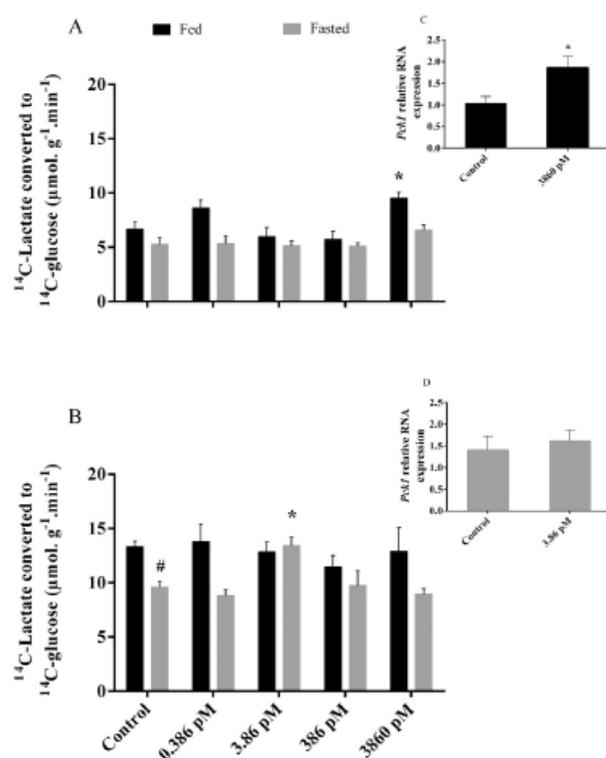


Fig. 4. Effects of hSTC-1 concentrations on gluconeogenesis from ¹⁴C-lactate in renal cortex (A) and medulla (B) of fed and fasted rats. Bars represent means \pm SEM, control group $n = 12$, treated groups $n = 8$; * $P < 0.05$, hSTC-1 vs. control group (hormone effect) in fed or fasted state; # $P < 0.05$, fed vs. fasted state (fasted effect). Overlapping graphics represent the effect of hSTC-1 (3.86 and 3860pM) on RNAm levels of *Pck1* (phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic) in renal cortex from fed rats (C) and renal medulla from fasted rats (D). The bars represent means \pm SEM, control group $n = 5$, treated group $n = 4$. * $P < 0.05$ vs. control group. hSTC-1, stanniocalcin-1.

concentration stimulation.

The L-lactate contribution to glucose production in renal gluconeogenesis is higher about 60% and glutamine contributes only with 20% [3,27]. In the renal CX from fed rats, the gluconeogenesis activity from ¹⁴C-lactate increased only at 3860pM of hSTC-1, the other hormone concentrations were ineffective. This rise in the gluconeogenesis activity in renal CX was induced by increase of *Pck1* gene expression. The presence of STC-1 binding sites on the mitochondrial membrane and the evidence for direct effects of this hormone on the mitochondrial metabolism suggest that STC-1 would be the factors that control renal gluconeogenesis from lactate, but only with higher hormones concentration [6,31,32]. In the physiological highlight, the stimulation of the gluconeogenesis activity from ¹⁴C-lactate induced by hSTC-1 in the renal CX from fed animals can increase the glucose contribution, especially in type-2 diabetes mellitus patients, when abnormal rise in hepatic gluconeogenesis associated with high PEPCK activity contribute to hyperglycemia in fed state [1,3,27]. However, in the renal MD from fed rats, the hSTC-1 in the concentrations used in this study did not affect the gluconeogenesis activity from ¹⁴C-lactate. Previous study showed that hSTC-1 at 3.86pM decreases renal gluconeogenesis activity in the MD from fed rats when the precursor was ¹⁴C-glutamine [6]. Also, in rats submitted to water deprivation the cortical and medullary renal STC1 genes respond differently [33]. These findings suggest that in proximal renal tubules from fed rats, hSTC-1 effects on gluconeogenesis pathway depend on precursor type (glutamine or lactate), hormone concentration and renal structure: cortex or medulla.

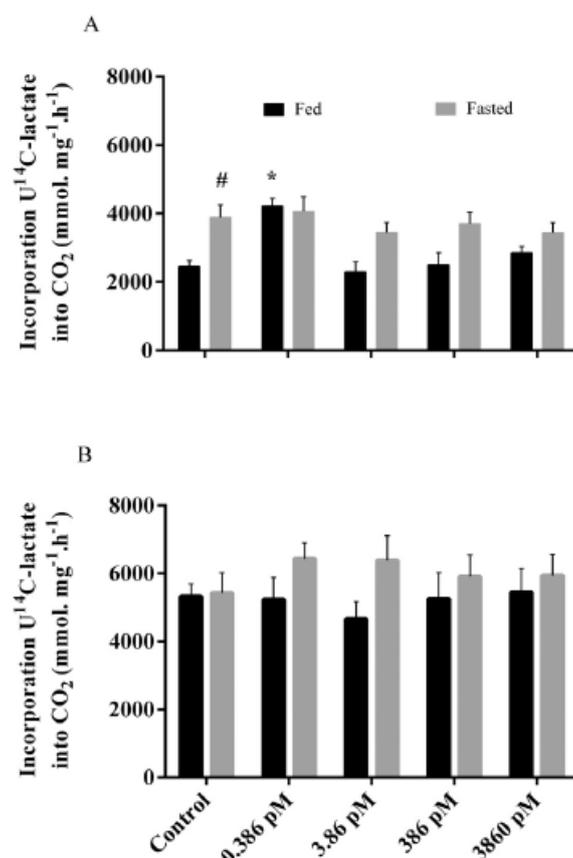


Fig. 5. Effect of hSTC-1 concentrations on ¹⁴C-lactate oxidation in renal cortex (A) and medulla (B) from fed and fasting rats. The bars represent means \pm SEM, control group $n = 10$, treated groups $n = 8$; * $P < 0.05$, hSTC-1 vs. control group (hormone effect) in fed state; # $P < 0.05$, fed vs. fasted state (fasted effect). hSTC-1, human stanniocalcin-1.

In post-absorptive fasting conditions, 75–80% of glucose released into circulation is from liver and the others 20–25% are from kidneys. Fasting for 48 h decreased markedly the liver glycogen concentration and plasma glucose levels in rats [34,35] but increase by 65% the lactate concentration in plasma [14]. However, gluconeogenesis activity from ¹⁴C-lactate in renal CX of fasting control rats was similar to that of fed control animals. This finding is consistent with the data on ¹⁴C-lactate oxidation increase found in control renal CX after 48 h fasting, probably to provide energy and NADH to renal gluconeogenesis. In the fasting rats, hSTC-1 did not alter the gluconeogenesis activity from ¹⁴C-lactate in renal CX; however this hormone increased markedly the liver gluconeogenesis from ¹⁴C-lactate in fasting rats [34].

On the other hand, in the renal MD from control fasting rats, the gluconeogenesis capacity from ¹⁴C-lactate decrease about 32% when compared to fed rats. After 48 h of food restriction, the glucose supply to outer medulla is limited and, therefore, decreasing the ATP concentration necessary to maintain the gluconeogenesis activity. In opposition, in the renal MD from fasting animals, hSTC-1 at 3.86pM raised by 32% the gluconeogenesis capacity from ¹⁴C-lactate. However, the *Pck1* gene expression did not increase. These results are coherent with the presence of STC-1 receptors and high levels of immunoreactive STC-1 in the S3 segment of the renal proximal tubules [31,36–38]. Therefore, hSTC-1 increasing in the fasting state (48 h) the gluconeogenesis capacity from ¹⁴C-lactate in the renal MD and liver contributes to lactate homeostasis, preventing the dangerous condition of lactic acidosis, and supplies glucose to other tissues [34]. This response may represent

a strategy of action of STC-1 in response to fasting stress as postulated by different authors [11,39].

The fed rats were kept with food until the moment of the experiment. Glucose homeostasis in these animals was maintained mainly by renal and intestinal glucose absorption and circulating glucose and insulin levels were elevated [13]. In this metabolic profile the expression of gluconeogenesis controlling genes was suppressed by insulin and increased in the glucose intestinal absorption. The increase of ^{14}C -lactate oxidation stimulated by 0.386 pM hSTC1 in renal CX of fed rats suggests a bypass of lactate from gluconeogenesis pathway to ATP synthesis to increase the energy sources. In the renal cortex, proximal tubules depend on the efficiency of oxidative phosphorylation to produce ATP that drives the active transport of glucose, ions and nutrients [30]. Due to the high energy demand of proximal tubules, aerobic respiration is their primary mechanism of ATP production. On the other hand, hSTC-1 at the concentrations used in this study did not affect the oxidation of ^{14}C -lactate in renal CX of fasting rats. However, in renal CX from fasting rats the hSTC-1 increased ^{14}C -glucose synthesis production from ^{14}C -lactate, suggesting a bypass of the ^{14}C -lactate from the oxidative pathway to gluconeogenesis pathway.

In the renal MD control group the ^{14}C -lactate oxidation was markedly higher when compared to control renal CX group, confirming the elevated lactate oxidation capacity of the renal MD, but hSTC-1 did not affect this pathway in both fed and fasting rats.

5. Conclusion

The findings show that hSTC-1 increases the renal gluconeogenesis activity, contributing to lactate homeostasis and supplies glucose to other tissues. This response may represent a strategy of action of STC-1 in response to fasting stress as postulated by different authors. On the other hand, hSTC-1 acts downstream of adenylylase pathway, decreasing the gluconeogenesis activity induced by cAMP intracellular increase or stimulating the phosphodiesterase activity in the renal CX. However, no hSTC-1 effect on ^{14}C -lactate oxidation was found after increase in the intracellular cAMP. In addition, data revealed that the renal cortex and medulla respond differently to hSTC1, possibly due to the higher level of STC-1 gene expression in inner renal medulla than in renal cortex.

Declaration of competing interest

We declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank the Postgraduate Program in Biological Science: Physiology, Department of Physiology, Institute of Health Basic Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul for providing technical support. The authors thank Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Junior by the gentle supply of labeled glucose. RSMS is a PQ-CNPq (308962/2017-6) fellow. SKS, ES, ELV, DSR, RBF and JFAM are Doctoral CNPq fellows, and GV is graduate CNPq fellow. VS is a Postdoctoral PNPd-CAPES fellow.

References

- [1] A. Mather, C. Pollock, Glucose handling by the kidney, *Kidney Int. Suppl.* 79 (2011) S1–S6, <https://doi.org/10.1038/ki.2010.509>.
- [2] A. Conjard, M. Mireille, G. Jérôme, G. Baverel, B. Ferrier, Gluconeogenesis from glutamine and lactate in the isolated human renal proximal tubule: longitudinal heterogeneity and lack of response to adrenaline, *Biochem. J.* 377 (2001) 371–377, <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600371>.
- [3] M. Alsahli, J.E. Gerich, Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 133 (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.07.033>.
- [4] C.M. Croniger, Y. Olswang, L. Reshef, S.C. Kalhan, S.M. Tilghman, R.W. Hanson, Mini-series: modern metabolic concepts phosphoenolpyruvate carboxykinase

- revisited, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 30 (2002) 14–20.
- [5] K. Kurokawa, S.G. Massry, Evidence for stimulation of renal gluconeogenesis by catecholamines, *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 961–964, <https://doi.org/10.1172/JCI107261>.
 - [6] V. Schein, L.C. Kucharski, P.M.G. Guerreiro, T.L. Martins, I. Morgado, D.M. Power, A.V.M. Canário, R.S.M. da Silva, Stanniocalcin 1 effects on the renal gluconeogenesis pathway in rat and fish, *Mol. Cell. Endocrinol.* 414 (2015) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.010>.
 - [7] A.C.M. Chang, J. Janosi, M. Hulsbeek, D. de Jong, K.J. Jeffrey, J.R. Noble, R.R. Reddel, A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin, *Mol. Cell. Endocrinol.* 112 (1995) 241–247, [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03601-3](https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03601-3).
 - [8] H.S. Olsen, M.A. Cepeda, Q.Q. Zhang, C.A. Rosen, B.L. Vozzolo, G.F. Wagner, Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. Biochem.* 93 (1996) 1792–1796, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.1792>.
 - [9] K. Ishibashi, M. Imai, Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 111 (2002) 1333–1346, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00364.2000>.
 - [10] M. Serlachius, K.Z. Zhang, L.C. Andersson, Stanniocalcin in terminally differentiated mammalian cells, *Peptides* 25 (2004) 1657–1662, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.031>.
 - [11] B.H.Y. Yeung, A.Y.S. Law, C.K.C. Wong, Evolution and roles of stanniocalcin, *Mol. Cell. Endocrinol.* 349 (2012) 272–280, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.007>.
 - [12] R. Hjortebjerg, D.E. Berryman, R. Comisford, E.O. List, C. Oxvig, M. Bjerre, J. Frystyk, J.J. Kopchick, Depot-specific and GH-dependent regulation of IGF binding protein-4, pregnancy-associated plasma protein-a, and stanniocalcin-2 in murine adipose tissue, *Growth Hormon. IGF Res.* 39 (2018) 54–61, <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2018.01.001>.
 - [13] E. Sampio, S.K. De Souza, J.F.A. Model, M. Trapp, R.S.M. Da Silva, Stanniocalcin-1 and -2 effects on glucose and lipid metabolism in white adipose tissue from fed and fasted rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 97 (2019) 916–923, <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0023>.
 - [14] E. Sarapio, S.K. Souza, E.L. Vogt, D.S. Rocha, R.B. Fabres, M. Trapp, R.S.M. Da Silva, Effects of stanniocalcin hormones on rat brown adipose tissue metabolism under fed and fasted conditions, *Mol. Cell. Endocrinol.* 485 (2019) 81–87, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.02.004>.
 - [15] P. De Niu, D.P. Radman, E.M. Jaworski, H. Deol, R. Gentz, J. Su, H.S. Olsen, G.F. Wagner, Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay: serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat, *Mol. Cell. Endocrinol.* 162 (2000) 131–144, [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00199-4).
 - [16] S.R. Terra, J. Carlos, R. Cardoso, R.C. Fêlix, L. Anderson, M. Martins, D. Onofre, G. Souza, F.C.R. Guma, A. Vicente, M. Canário, V. Schein, STC1 interference on calcitonin family of receptors signaling during osteoblastogenesis via adenylate cyclase inhibition, *Mol. Cell. Endocrinol.* 403 (2015) 78–87, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.010>.
 - [17] P.F.S. Palma, C. Bock, T.S. Silva, P.M. Guerreiro, D.M. Power, H.O. Pörtner, A.V.M. Canário, STC1 and PTHrP modify carbohydrate and lipid metabolism in liver of a teleost fish, *Sci. Rep. Nat.* 9 (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36821-2>.
 - [18] A.G. Cozer, M. Trapp, C. Vieira Marques, T.L. Martins, J.F.A. Model, V. Schein, L.C. Kucharski, R.S.M. Da Silva, Stanniocalcin 1 enhances carbon flux from glucose to lipids in white retroperitoneal adipose tissue in the fed rat, *Lipids* 51 (2016) 1303–1307, <https://doi.org/10.1007/s11745-016-4202-5>.
 - [19] A.G. Cozer, M. Trapp, T.L. Martins, L.S. De Fraga, C.V. Marques, J.F.A. Model, V. Schein, L.C. Kucharski, R.S.M. Da Silva, Effects of Stanniocalcin-1 on glucose flux in rat brown adipose tissue, *Biochimie* 138 (2017) 50–55, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.04.008>.
 - [20] H.A. Krebs, T. Yoshida, Renal gluconeogenesis. 2. The gluconeogenic capacity of the kidney cortex of various species, *Biochem. J.* 89 (1963) 398–400, <https://doi.org/10.1042/bj0890398>.
 - [21] A. Maleque, H. Endou, C. Koseki, F. Sakai, Nephron heterogeneity: gluconeogenesis from pyruvate in rabbit nephron, *FEBS Lett.* 116 (1980) 154–156, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80631-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80631-4).
 - [22] D. Bueno, I.R. Azzolin, M.L.S. Perry, Ontogenetic study of glucose and lactate utilization by rat cerebellum slices, *Med. Sci. Res.* 22 (1994) 631–632.
 - [23] T.D. Schmittgen, K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 1101–1108, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>.
 - [24] A.Y. Law, C.K. Wong, J. Turner, A.A. Gonzalez, M.C. Prieto, G.F. Wagner, Vasopressin controls stanniocalcin-1 gene expression in rat and mouse kidney, *Mol. Cell. Endocrinol.* 348 (2012) 183–188, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.005>.
 - [25] T. Svingen, H. Letting, N. Hadrup, U. Hass, A.M. Vinggaard, Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions, *Peer J* 3 (2015) 1–15, <https://doi.org/10.7717/peerj.855>.
 - [26] M. Stumvoll, C. Meyer, A. Mitrakou, V. Nadkarni, J.E. Gerich, Renal glucose production and utilization: new aspects in humans, *Diabetologia* 40 (1997) 749–757, <https://doi.org/10.1007/s001250050745>.
 - [27] M.T. Swe, A. Pongchaidecha, V. Chatsudthipong, N. Chattipakorn, A. Lungkaphin, Molecular signaling mechanisms of renal gluconeogenesis in nondiabetic and diabetic conditions, *J. Cell. Physiol.* 234 (2019) 8134–8151, <https://doi.org/10.1002/jcp.27598>.
 - [28] C.W. Luo, K. Kawamura, C. Klein, A.J.W. Hsueh, Pancreatic regulation of ovarian granulosa cell differentiation by stanniocalcin (STC) 1: mediation through specific

- STC1 receptors, *Mol. Endocrinol.* 18 (2004) 2085–2096, <https://doi.org/10.1210/me.2004-0066>.
- [29] H. Yamada, G. Seki, S. Taniguchi, S. Uwatoko, K. Nosaka, K. Suzuki, K. Kurokawa, Roles of Ca^{2+} and PKC in regulation in isolated proximal tubules of acid/base transport, *Am. J. Phys.* 271 (1996) 1068–1076, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.5.F1068>.
- [30] P. Bhargava, R.G. Schnellmann, Mitochondrial energetic in kidney, *Nat. Rev. Nephrol.* 176 (2017) 139–148, <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- [31] C.R. McCudden, K.A. James, C. Hasilo, G.F. Wagner, Characterization of mammalian stanniocalcin receptors: mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 45249–45258, <https://doi.org/10.1074/jbc.M205954200>.
- [32] J.P. Ellard, C.R. McCudden, C. Tanega, K.A. James, S. Ratkovic, J.F. Staples, G.F. Wagner, The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates, *Mol. Cell. Endocrinol.* 264 (2007) 90–101, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.008>.
- [33] J. Turner, F.L. Xiang, Q. Feng, G.F. Wagner, The renal stanniocalcin-1 gene is differentially regulated by hypertonicity and hypovolemia in the rat, *Mol. Cell. Endocrinol.* 331 (2011) 150–157, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.09.010>.
- [34] S.K. De Souza, E. Sarapio, E.L. Vogt, V. Schein, R.B. Fabres, J.F.A. Model, M.V. Lima, D.S. Rocha, R.S.M. Da Silva, Effects of Stanniocalcin Hormones on Rat Hepatic Glucose Homeostasis Under Fed and Fasted Condition, press (2020).
- [35] B.D. Ross, R. Hems, H.A. Krebs, The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver, *Biochem. J.* 102 (1967) 942–951, <https://doi.org/10.1042/bj1020942>.
- [36] M. Haddad, S. Roder, H.S. Olsen, G.F. Wagner, Immunocytochemical localization of stanniocalcin cell in the rat kidney, *Endocrinology* 137 (1996) 2113–2117.
- [37] C.K.C. Wong, M.A. Ho, G.F. Wagner, The co-localization of stanniocalcin protein, mRNA and kidney cell markers in the rat kidney, *J. Endocrinol.* 158 (1998) 183–189, <https://doi.org/10.1677/joe.0.1580183>.
- [38] K. James, M. Seitelbach, C.R. McCudden, G.F. Wagner, Evidence for stanniocalcin binding activity in mammalian blood and glomerular filtrate, *Kidney Int.* 67 (2005) 477–482, <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67104.x>.
- [39] K.Z. Zhang, P.J. Lindsberg, T. Tatlisumak, M. Kaste, H.S. Olsen, L.C. Andersson, Stanniocalcin: a molecular guard of neurons during cerebral ischemia, *PNAS* (2000) 3637–3642 (www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.070045897).

4.2 Artigo 2 – Submetido.

Título: Effects of stanniocalcin hormones on rat hepatic glucose homeostasis under fed and fasted conditions. General and Comparative Endocrinology.

Cover Letter

Porto Alegre, June 13, 2020

Dr. Deborah Power
Editor in Chief of General and Comparative Endocrinology

Dear Dr. Deborah Power,

Please find enclosed the letter with corrections made in the final version of the manuscript entitled "Effects of stanniocalcin hormones on hepatic glucose homeostasis under fed and fasted conditions (manuscript number GCE_2019_498)". The responses to the questions have been incorporated into the manuscript.

I hope that this final version of the manuscript may be accepted for publication in the General and Comparative Endocrinology. We look forward to hearing from you.

Sincerely yours,

Samir K. de Souza

Ms Samir Khal de Souza
Depto. de Fisiologia, ICBS, UFRGS
Rua Sarmiento Leite, 500
90.050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
samirks@hotmail.com

General and Comparative Endocrinology

Effects of stanniocalcin hormones on rat hepatic glucose homeostasis under fed and fasted conditions

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	GCE_2019_498R1
Article Type:	Full Length Article
Section/Category:	
Keywords:	Homeostasis; glucose; fed; Liver; fasting.; Stanniocalcins
Corresponding Author:	Samir Khal De Souza, MS Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude Porto Alegre, Brazil
First Author:	Samir Khal De Souza, MS
Order of Authors:	Samir Khal De Souza, MS Elaine Sarapio, Dr Everton Vogt, MS Vanessa Schein, Dr Rafael Fabres, MS Jorge Felipe Model, MS Matheus Vieira Lima, Graduation student Debora Rocha, MS Roselis Da Silva, Dr
Abstract:	To test the hypothesis of conservation of stanniocalcin 1 and 2 (STC-1; STC-2) functions in vertebrates, we examined if these hormones may be implicated in regulation of gluconeogenesis pathway, glycogen synthesis and 14C-glucose conversion to 14CO ₂ in the liver from fed and fasting Wistar rats (<i>Rattus norvegicus</i>). Stc1 and Stc2 gene expressions in liver, increasing after fasting. STC-1 participates in regulation of the hepatic gluconeogenesis pathway in rats when the precursor was 14C-lactate. STC-2 demonstrates opposite signaling on rat hepatic gluconeogenesis activity and Pck1 gene expression—decreasing in the fed state when the substrate was 14C-alanine, and increasing during fasting when the substrate was 14C-lactate. STC-1 and 2 in the concentrations used in this study does not affect glycogen concentration and synthesis from 14C-glucose, or 14C-glucose conversion to 14CO ₂ in livers from fed or fasting rats. The findings highlight the role of stanniocalcins in the hepatic gluconeogenesis pathway in mammals and confirm the conservation of STC-1 and STC-2 metabolic functions in the vertebrates.
Suggested Reviewers:	Luis Carlos Navegantes navegantes@ufmrp.usp.br Metabolism researcher Thomas Moon tmoon@scienceuottawa.ca Metabolism researcher Pedro Palma pfpalma@ualg.pt Stanniocalcins researcher
Opposed Reviewers:	
Response to Reviewers:	

Abstract

To test the hypothesis of conservation of stanniocalcin 1 (STC-1) and STC-2 functions in vertebrates, we hypothesized that human stanniocalcin (hSTC-1) and hSTC-2 may be implicated in regulation of glucose homeostasis in the liver from fed and 24h-fasting *Rattus norvegicus*. The results from this study show an increase in *Stc1* and *Stc2* gene expression in liver from fasting rats, thus confirming the participation of these hormones in cellular response to food restriction stress in vertebrates. In rat liver, the stanniocalcins effects on hepatic gluconeogenesis depend on fed or fasting hormonal and metabolic patterns of the animal and the precursor of the pathway used. However, stanniocalcins in the concentrations used in this study do not affect glycogen concentration and synthesis from ^{14}C -glucose, or ^{14}C -glucose conversion to $^{14}\text{CO}_2$ in livers from fed or fasting rats. The present study was the first to demonstrate the effect of hSTC-1 and hSTC-2 on glucose homeostasis in liver from fed and fasted rats. These findings highlight the role of stanniocalcins in the hepatic gluconeogenesis pathway in mammals and confirm our hypothesis of conservation of STC-1 and STC-2 functions in carbohydrate metabolism in vertebrates.

**Effects of stanniocalcin hormones on rat hepatic glucose homeostasis under fed
and fasted conditions**

Samir Khal De Souza, Elaine Sarapio, Everton Lopes Vogt, Vanessa Schein, Rafael
Bandeira Fabres, Jorge Felipe Argenta Model, Matheus Vieira Lima, Debora Santos
Rocha, Roselis Silveira Martins Da Silva

Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brazil

Correspondence: Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, CEP: 90050-
170, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: samirks@hotmail.com

Phone number: +55 51 33083623

1. Introduction

Stanniocalcin 1 (STC1) secreted by the Corpuscles of Stannius (CS) is an established hypocalcemic factor in bony fish from where it was first isolated (Yeung et al., 2012). Recently, two fish STC1 isoforms encoded by paralogue genes have been identified: STC1-A, strongly expressed in the CS, and STC1-B, only faintly expressed in various tissues (Schein et al., 2012). In *Anguilla japonica*, STC1 inhibited the expression of gill Ca^{2+} transport (GCAT), affecting systemic Ca^{2+} homeostasis, presumably via a cAMP pathway (Gu et al., 2015). STC1-A stimulates phosphate reabsorption by renal proximal tubules, resulting in an increase in serum phosphate that combines with excess calcium to deposit into bone and scales (Stasko and Wagner, 2001; Stasko et al., 2001; Chang and Reddel, 1998; Huang et al., 2009). In mammals, studies identified the expression of hormones homologous to fish STC, called SCT-1 and STC-2. These hormones are present in many tissues such as liver, kidneys, heart, lung, stomach, pancreas and brown and white adipose tissues (Ishibashi and Imai, 2002; Yeung et al., 2012; Hjortebjerg et al., 2018; Sarapio et al., 2019a). The role of STC-1 on intermediary metabolism has been demonstrated in transgenic mice that overexpress this hormone (Filvaroff et al., 2002). In these animals food and oxygen consumption increase, but a decrease in the body weight occurs (Filvaroff et al., 2002). Energy waste in these mice is due to the stimulating effects of STC-1 on mitochondrial electron transport (McCudden et al., 2004). Metabolic effects of human STC-1 (hSTC-1) on rat carbohydrate and lipid metabolisms were found in kidney, white and brown adipose tissues, and liver (Gonçalves, 2012; Schein et al., 2015; Sarapio et al., 2019a; b). In fed rats, hSTC-1 decreased renal gluconeogenic activity when the substrate was ^{14}C -glutamine (Schein et al., 2015). Previous studies conducted by our research group show that, in rats, hSTC-1 increased lipid synthesis from glucose and elevated ADP/ATP

ratios in the liver (Gonçalves, 2012). Also, in the sea bass *Dicentrarchus labrax*, STC-1 A and B control glucose synthesis via renal gluconeogenesis (Schein et al., 2015). Recently, Palma et al. (2019) showed that STC-1 promoted hepatic gluconeogenesis from different substrates in the European sea bass, evidencing the role of this hormone in strategic energy mechanisms in fish.

In sole *Paralichthys olivaceus*, STC-2 was found to be present with sequence homology and phylogenetic characteristics similar to those of STC-2 observed in other vertebrates (Shin and Sohn, 2009). In this sole, this hormone was expressed in such different tissues as liver, gills, kidneys (Shin and Sohn, 2009). In mammals, STC-2 is expressed in practically all tissues, regulating various physiological and biochemical processes (Zeiger et al., 2011; Yeung et al., 2012; Zhao et al., 2018; Sarapio et al., 2019a; b). Metabolic effects of hSTC-2, such as controlling lipid synthesis from glucose, have been demonstrated in brown and white adipose tissues from fasted and fed rats (Sarapio et al., 2019 a; b). Jiao et al. (2017) demonstrated that STC-2 is an anorexic factor that reduces white adipose mass in rats. An *in vitro* study with fed rat liver showed that hSTC-2 increased the pyruvate kinase (PK) activity (Gonçalves, 2012).

Gluconeogenesis is a ubiquitous process, present in plants, animals, fungi, bacteria, and other microorganisms. In vertebrates, gluconeogenesis takes place mainly in the liver, kidneys and intestine (Adeva-Andany et al., 2014). In most vertebrates, glucose is a primary fuel to tissues and its blood levels are maintained within a relatively fine range. Glycogenolysis is the major pathway to produce glucose in liver during short-term fasting periods (Zhang et al., 2019). When glycogen is depleted, hepatic gluconeogenesis becomes the main alternative for maintaining blood glucose levels (Zhang et al., 2019). Hepatic gluconeogenesis is an important pathway in the

regulation of glucose homeostasis in vertebrates; it is a process that transforms non-carbohydrate substrates (such as lactate, amino acids, and glycerol) into glucose. However, the abnormal increase in hepatic gluconeogenesis associated with the high activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in humans and rats contributes to hyperglycemia in both diabetes 1 and 2 (Croniger et al., 2002; Rines et al. 2016).

PEPCK is an important enzyme that converts oxaloacetate to phosphoenolpyruvate, regulating the gluconeogenesis pathway (Croniger et al., 2002). There are two isoforms of PEPCK in animal cells: the *Pck1* gene encodes a cytosolic isoform, also known as PEPCKc, and the *Pck2* gene encodes a mitochondrial isoform (PEPCKm) (Beale et al 2007; Grasmann et al 2019).

Gluconeogenesis in vertebrates is modulated by different factors, such as nutrient and energy conditions, exercise, stress, autonomic nervous system and hormones. Among the main precursors of the hepatic gluconeogenesis pathway are alanine and lactate. Hormone signals are stimulators or inhibitors, such as glucagon, glucocorticoids and insulin, which modulate the gluconeogenesis pathway and regulate genes expression, enzymatic activities and glucose production (Zhang et al., 2019).

It was proposed that STC-1 participates in the regulation of plasma glucose in both rats and fish, affecting gluconeogenesis activity in the kidney (Schein et al., 2015). Moreover, STC-1 promoted hepatic gluconeogenesis from different substrates in the European sea bass (Palma et al., 2019). Thus, to test the hypothesis of conservation of STC-1 and STC-2 functions in vertebrates, we hypothesized that hSTC-1 and hSTC-2 may be implicated in regulation of gluconeogenesis pathways in the rat liver. It has been suggested that stanniocalcins would be involved in the cellular stress response. Fasting (24h) is a stressful situation for rats and metabolic strategies are triggered to maintain

glucose homeostasis. Here we assume that in the fed and fasting *Rattus norvegicus* livers (24h), the recombinant human STC-1 (hSTC-1) and STC-2 (hSTC-2) would be involved in the regulation of: (i) gluconeogenic capacity; (ii) expression of the PEPCKc (*Pck1*) gene; (iii) glycogen synthesis and concentration; and (iv) glucose oxidation. In addition, to determine the participation of STCs in response to fasting stress, gene expression of STC-1 (*Stc1* gene) and STC-2 (*Stc2* gene) hormones were estimated.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Experiments were carried out in adult male Wistar (*Rattus norvegicus*) rats, weighing 300±50g. The rats were housed in cages with 2–3 animals per cage and kept at 22±2°C with a regular light/dark cycle of 12h/12h. All animals were acclimatized in the animal care facility for at least two weeks before the experiments and randomly divided into fed and fasted groups. Fed rats received standard rodent diet (20% protein, 55% carbohydrate and 4.5% lipids; Nutrilab® Brazil) and water *ad libitum*. Fasted rats were housed in individual cages with a greater amount of wood shavings to improve thermal comfort, and fasted for 24h with access to water *ad libitum*. All experiments were performed at 08:00–10:00 a.m. to minimize the circadian rhythm effect. The protocols were approved by the official animal ethical committee (#29392) of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

2.2. Hormones

Recombinant human STC1 (hSTC1) and STC2 (hSTC2) were purchased from Ray Biotech Inc. (USA). The hSTC-1 and hSTC-2 concentrations used in this study were 3.86 and 38.6 pM, as previously used in studies from our laboratory to

demonstrate the effects of these hormones on renal gluconeogenesis (Schein et al., 2015; Souza et al., 2020) and glucose flux in rat white and brown adipose tissues (Cozer et al., 2017; Sarapio et al., 2019a; b).

2.3. In vitro experiments

Rats were euthanized and blood samples were immediately collected into tubes containing a clot activator agent. Following centrifugation at 1000 xg for 10 min, serum was separated and stored at -80°C prior to analysis. The livers were immediately excised and placed on ice in Petri dishes with cold Krebs Ringer Bicarbonate (KRB) buffer pH 7.4 and immediately sliced with a manual slicer. Slices (100±10mg; 800–1000µm thick) from fed and fasting rats were distributed between the control (without hormones) and experimental groups (with hormones). In mammals, STC-1 and STC-2 exhibit paracrine, autocrine and intracrine functions (Yeung et al., 2012). Thus, we chose to slice the liver because cellular isolation would compromise communication between cells. In all experiments, the slices were pre-incubated for 15 min without hormones in sealed flasks with 1mL KRB buffer pH 7.4, equilibrated with O₂:CO₂ (95:5, v/v). Following the pre-incubation period, liver slices were removed from the medium, dried and incubated for 60 min in sealed flasks containing 1 ml of KRB pH 7.4 with 1% bovine albumin (BSA) and 1% phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), equilibrated with O₂:CO₂ (95:5, v/v) in the absence or presence of 3.86 pM and 38.6 pM of hSTC-1 or hSTC-2 hormone. Pre-incubation and incubation were performed in the Dubnoff metabolic incubator under constant shaking at 37°C. The radioactivity measurement was performed in an LKB-Wallac liquid scintillation spectrometer.

2.4. Gluconeogenesis assay

Following pre-incubation, liver ($100\pm 10\text{mg}$) slices were incubated under the conditions described in Section 2.3, but in the presence of $0.10\ \mu\text{Ci}$ of L-[U- ^{14}C]-alanine (^{14}C -alanine) ($151\text{mCi}/\text{mmol}$; Perkin Elmer) plus $5\ \text{mM}$ unlabeled L-alanine or $0.10\ \mu\text{Ci}$ of L-[U- ^{14}C]-lactate (^{14}C -lactate) ($154\text{mCi}/\text{mmol}$; Perkin Elmer) plus $5\ \text{mM}$ unlabeled L-lactate. After addition of the unlabeled substrates, the pH of the incubation medium was determined. Previous studies showed that under experimental conditions, 5% CO_2 did not affect gluconeogenic capacity (Schein et al., 2015). At the end of incubation, the medium was deproteinized and ^{14}C -glucose, formed from L-[U- ^{14}C]-alanine or L-[U- ^{14}C]-lactate, was separated by thin-layer chromatography using: n-butanol 95% ; ethyl alcohol 5.4% ; acetic acid in water ($75:47.4:27.6$, v/v/v). The spot corresponding to ^{14}C -glucose, localized by spraying with an anisaldehyde reagent (95% ethyl alcohol/concentrated sulfuric acid/p-methoxybenzaldehyde $18:1:1$, v/v/v) was marked, scraped off and dissolved in scintillation liquid (SLC): toluene:triton X-100 ($2:1$, v/v)-PPO 0.4% , POPOP 0.01% . The values of gluconeogenic activity are given as μmol of L-[U- ^{14}C]-lactate or L-[U- ^{14}C]-alanine converted to ^{14}C -glucose. g^{-1} of tissue. min^{-1} .

2.5. Glycogen synthesis

Following pre-incubation, liver ($100\pm 10\text{mg}$) slices were incubated under the conditions described in Section 2.3, but in the presence of $0.10\ \mu\text{Ci}$ of [U- ^{14}C]-glucose ($289\text{mCi}/\text{mmol}$; Perkin Elmer) plus $5\ \text{mM}$ unlabeled D-glucose. For ^{14}C -glycogen determination, the slices were removed, rinsed in cold KRB buffer pH 7.4, blotted with filter paper, immediately transferred to 0.5M KOH and boiled for $60\ \text{min}$. Proteins were precipitated in 30% trichloroacetic acid (TCA) and 1N HCl ($2:1$, v/v); after centrifugation at 600g for $10\ \text{min}$, the supernatant ($30\ \mu\text{L}$) was applied on Whatman

3MM strips. Glycogen was precipitated with 66% ethanol at final concentration (Thomas et al., 1968). As a blank, the strip without the tissue sample was subjected to the same procedure. The wet strips were transferred to vials containing 2 mL of SLC and the glycogen synthesis activity is given as μmol of ^{14}C -glucose incorporated into glycogen. mg^{-1} of tissue. min^{-1} .

2.6. Conversion of [U- ^{14}C]-glucose to $^{14}\text{CO}_2$

After pre-incubation, liver ($100\pm 10\text{mg}$) slices were incubated under the conditions described in Section 2.3, but in the presence of $0.10\mu\text{Ci}$ of [U- ^{14}C]-glucose ($289\text{mCi}/\text{mmol}$; Perkin Elmer) and 5mM of unlabeled glucose. The flasks contained small glass wells inside that were attached to the rubber caps and above the level of the incubation medium. The wells contained small strips of Whatman 3MM paper and 1M Hyamine[®] hydroxide (0.2mL) to trap the $^{14}\text{CO}_2$ produced. Incubation was stopped by adding 0.5mL of 50% TCA through the rubber cap (Bueno et al., 1994). Subsequently, the glass wells were transferred to vials containing 2mL SLC. Values of $^{14}\text{CO}_2$ production are expressed as mmol of ^{14}C glucose converted to $^{14}\text{CO}_2.\text{mg}^{-1}$ of tissue. h^{-1} .

2.7. RNA isolation, cDNA synthesis, and real-time quantitative PCR

Following pre-incubation, liver ($100\pm 10\text{mg}$) slices were incubated under the conditions described in Section 2.3. To perform mRNA analysis, liver slices were homogenized in Trizol[®] Reagent (*Invitrogen*). RNA was extracted using the chloroform-isopropanol method according to the manufacturer's instructions. One μg RNA was reverse-transcribed using the GoScript Reverse Transcription System (Promega) in a total volume of $20\mu\text{l}$. Gene-specific primers were mixed with Platinum SYBR Green qPCRSuperMix-UDG (*Invitrogen*) to a final concentration of $0.2\mu\text{M}$.

cDNA was diluted 1:10, and aliquots were run in triplicate. Thermal cycling conditions were 10 s at 95°C, 20 s at 60°C, 15 s at 95°C, 15 s at 60°C, 15 s at 95°C and 40 cycles followed by melting curve analysis on a StepOne Real-Time qPCR system (Applied Biosystems). The ΔC_t method ($2^{-\Delta C_t}$) was used to calculate relative changes in mRNA abundance, i.e., Ct values for beta-actin rRNA were subtracted from the Ct value of *Pck1*, *Stc1* and *Stc2* to adjust for variability in cDNA synthesis. Primer sequences were:

Primers	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
<i>Stc1</i>	GTGACACAGATGGGATGTACG	AAAGTAGAACACCTCCGAATGG
<i>Stc2</i>	ACTCTTGTGAAATCCAGGGC	TTGAGATAGCATTCCCTCTGC
<i>Pck1</i>	TCTGATCCAGACCTTCCAAAAG	CAAACCTCCTCACTTCCTGG
<i>Actb</i>	ATTGCTGACAGGATGCAGAA	TAGAGCCACCAATCCACACAG

Briefly, 1 mg RNA was run in 1% agarose gel with bleach (SYBR Safe) at 100 mV for 30 min and detected under UV light. Three sharp bands representing ribosomal RNA (with no smearing) confirmed that the RNA samples were not degraded (Lardizábal et al., 2012; Law et al., 2012; Svingen et al., 2015; Schmittgen and Livak, 2008).

2.8. Tissue glycogen

Following pre-incubation, liver slices (100±10 mg) were incubated under the conditions described in section 2.3. Glycogen was extracted in accordance with Van Handel (1965), and determined as glucose equivalents through the glucose-oxidase method (Labtest® kit, Brazil) after acid hydrolysis and neutralization with Na₂CO₄. Results are expressed as mg glycogen.g⁻¹ of tissue.

2.9. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean and verified for normality (Kolmogorov–Smirnov test). Two-way ANOVA with Dunnett *post-hoc* test was used for pairwise comparison of gluconeogenesis, synthesis and glycogen concentration, oxidation and expression of *Stc1* and *Stc2*. One-way analysis of variance with Dunnett *post-hoc* test was used for comparison of mRNA *Pck1*. Unpaired Student's t-test was used to compare differences in serum between fed and fasted groups. All tests and comparisons with $P < 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Prism Plot version 6.0 (GraphPad Prism Software).

3. Results

3.1 Fasting increase hepatic *Stc1* and *Stc2* gene expression

In fed rats, *Stc1* gene expression in liver was markedly higher (Fig. 1). In contrast, *Stc2* gene expression was undetectable in liver from fed rats (Fig. 1). However, after 24h fasting the hormones' gene expressions were markedly increased ($P < 0.0001$) when compared with the fed state (Fig.1). In fasting, no difference ($P > 0.05$) between *Stc1* and *Stc2* expressions was found (Fig.1).

3.2 Stanniocalcins are involved in hepatic gluconeogenesis induction and modulation in fed and fasting

Although 24h fasting markedly decreased ($P < 0.05$) serum glucose levels compared to fed rats, it did not affect ($P > 0.05$) lactate concentration (Table 1). In addition, 24h fasting markedly ($P < 0.0001$) decreased liver glycogen concentration (Table 2). However, glycogen concentration in the liver slices from fasted and fed rats was not altered by either hSTC-1 ($P > 0.05$) or hSTC-2 ($P > 0.05$) as compared to control groups at any concentration tested (Table 2).

In fed or fasted control groups, gluconeogenesis activity from ^{14}C -lactate was about twofold ($P<0.05$) as high as from ^{14}C -alanine. However, hSTC-1 (3.86 or 38.6 pM) did not modify ($P>0.05$) gluconeogenesis activity from ^{14}C -alanine in liver slices from fasted or fed rats (Fig. 2A). On the other hand, hSTC-2 at 38.6 pM decreased by 20% ($P<0.05$) ^{14}C -glucose synthesis from ^{14}C -alanine in liver slices from fed rats as compared to the control group (Fig. 2B). Gluconeogenesis activity from ^{14}C -alanine in liver slices from fasted rats was not affected by hSTC-2 at any concentration tested (Fig. 2B). hSTC-1 at 3.86 or 38.6 pM did not alter ($P>0.05$) the gluconeogenesis capacity from ^{14}C -lactate in liver slices from fed rats (Fig. 2C). However, in liver slices from fasted rats, hSTC-1 at 38.6 pM increased ^{14}C -glucose synthesis from ^{14}C -lactate by 43% ($P<0.05$) as compared to the control group (Fig. 2C). In the fed state, hSTC-2 at any concentration tested did not alter ($P>0.05$) ^{14}C -glucose synthesis from ^{14}C -lactate in liver slices when compared to the control group (Fig. 2D). In contrast, at 3.86 or 38.6 pM of hSTC-2, gluconeogenesis activity from ^{14}C -lactate in liver slices from fasted rats increased by 50% ($P<0.05$) and 49% ($P<0.05$), respectively, when compared to the control group (Fig. 2D).

3.3 Stanniocalcins are involved in the hepatic PEPCKc gene expression in fed and fasting

No significant effect of hSTC-1 on gluconeogenic pathway activity was found in fed animals. Thus, we do not find it necessary to determine the effect of hSTC-1 on *Pck1* gene expression in the fed group. hSTC-2 at 3.86 pM and 38.6 pM decreased by 60% ($P<0.05$) and 62% ($P<0.05$), respectively, *Pck1* gene expression in liver slices from fed rats incubated in the presence of 5mM of L-alanine (Fig. 3A). hSTC-1 in liver slices from fasted rats incubated in the presence of 5mM of L-lactate at 3.86 pM did not affect ($P>0.05$) *Pck1* gene expression, but at 38.6 pM the enzyme expression increased

by 25%, but there was no statistical difference ($P>0.05$) (Fig. 3B). In liver slices from fasted rats incubated in the presence of 5mM of L-lactate and 3.86 pM of hSTC-2, the *Pck1* gene expression increased ($P<0.05$) by 40% (Fig. 3C).

3.4 Stanniocalcins do not affect hepatic glycogen concentration and synthesis, or glucose oxidation in fed and fasting

In liver slices from fasted (24h) control rats, $^{14}\text{CO}_2$ formation from ^{14}C -glucose increased ($P<0.001$) as compared to the fed group (Fig. 4A, B). However, the values of ^{14}C -glucose incorporated into $^{14}\text{CO}_2$ in liver slices from fasted and fed rats were not changed either by hSTC-1 ($P>0.05$) or by hSTC-2 ($P>0.05$) when compared to control groups at any concentration tested (Fig. 4A, B).

^{14}C -glycogen synthesis from ^{14}C -glucose in liver slices from fasted rats decreased ($P<0.001$) markedly when compared to fed rats (Fig. 5 A, B). In both fed and fasted states, STC at the concentrations used in this study did not alter the incorporation of ^{14}C from glucose into ^{14}C -glycogen (Fig. 5 A, B).

4. Discussion

Liver is an important metabolic organ responsible for approximately 80% of endogenous glucose production (Gerich, 2010). Pathways like gluconeogenesis and glycogenolysis regulated by nutrient and energy conditions, exercise, stress, and neural and hormonal signals, were involved in net glucose hepatic production (Petersen et al., 2017). The present study was the first to demonstrate the effect of hSTC-1 and hSTC-2 on glucose homeostasis in liver from fed and fasted rats.

In the fed state, the presence of *Stc1* gene expression in liver suggested the involvement of the STC-1 hormone in the metabolic control in this organ. Nevertheless, *Stc 2* gene expression in liver from fed rats was almost undetectable. Similarly, other

authors identified low expression of STC-2 proteins in rat livers (Chang et al., 1995; Chang and Reddel, 1998; Ishibashi et al., 1998; Varghese et al., 1998). In contrast, in brown adipose tissue from fed rats, *Stc2* gene expression was fourfold as high as *Stc1* gene expression (Sarapio et al., 2019a).

It is noteworthy that in the fed control groups, the synthesis capacity of glucose from ^{14}C -lactate was markedly higher than from ^{14}C -alanine. It may be suggested that a percentage of alanine in the liver slices was converted to L-lactate instead of pyruvate, decreasing the incorporation of ^{14}C -alanine into ^{14}C -glucose (Adeva-Andany, 2014).

In this study, hSTC-1 did not alter gluconeogenesis activity from ^{14}C -alanine or ^{14}C -lactate in liver from fed groups. In contrast, hSTC-1 decreased markedly the gluconeogenesis activity from ^{14}C -glutamine in the renal medulla from fed rats (Schein et al., 2015). Moreover, this hormone also decreased the PEPCK activity and *Pck2* gene expression in rat renal medulla (Schein et al., 2015). On the other hand, fish STC-1 increased markedly kidney gluconeogenesis activity from ^{14}C -glutamine in the sea bass *Dicentrarchus labrax* (Schein et al., 2015). In addition, STC-1 promoted hepatic gluconeogenesis from different substrates in the European sea bass (Palma et al., 2019). This data suggest a difference between vertebrates in the hSTC-1 effect on gluconeogenic pathway: in fed rats, this hormone decreased renal gluconeogenesis activity (Schein et al., 2015), and did not affect hepatic gluconeogenesis. In fish, STC-1 increased liver and kidney gluconeogenesis activities: in liver from different substrates, and in kidney from glutamine (Schein et al., 2015; Palma et al., 2019).

In contrast, in fed rats hSTC-2 decreased by 60% *Pck-1* mRNA levels, inducing a significant reduction in gluconeogenic activity from ^{14}C -alanine. Several studies have established that the PEPCKc enzyme would be regulated at transcriptional and translational levels (Stark et al., 2009; Yang et al., 2009). This study showed specific

transcriptional regulation of hepatic PEPCKc by the hSTC-2 hormone. Moreover, in the fed state, hSTC-2 also reduced the malate dehydrogenase (MDH) activity (Rossetti, 2013), decreasing the reduction of oxaloacetate to malate, thereby dropping the hepatic gluconeogenic capacity. Thus, hSTC-2 controls the gluconeogenesis activity from ^{14}C -alanine in liver from fed rats, regulating PEPCKc gene expression and malate formation in the mitochondria (Rossetti, 2013). A study in murine embryonic fibroblasts demonstrated that STC-2 regulates negatively the molecular mechanism of store-operated calcium entry (SOCE) (Zeiger et al., 2011). STC-2 interacts with the endoplasmic reticulum calcium sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1), reducing intracellular calcium levels (Zeiger et al., 2011). This reduction in the intracellular calcium concentration could suppress or decrease gluconeogenesis capacity in the same way as insulin decreases the activity of this pathway (Wang et al., 2012; Matsumoto, 2012). The reduction in the hepatic gluconeogenesis activity from ^{14}C -alanine in the fed state by hSTC-2 may be important to reduce glucose contribution, especially in type-2 diabetes mellitus patients, when abnormal increase in hepatic gluconeogenesis associated with high PEPCK activity contributes to hyperglycemia (Croniger et al., 2002; Rines et al., 2016).

On the other hand, when the substrate was ^{14}C -lactate, hSTC-2 was not able to alter gluconeogenic activity in liver from fed rats. Schein et al. (2015) found similar results in rat and fish, i.e., hSTC-1 reduced renal gluconeogenesis activity and PEPCKm gene expression in fed rats only when the substrate was ^{14}C -glutamine; when the precursor was ^{14}C -lactate, this hormone did not have any effect on this pathway. In fish, STC1-A increased renal gluconeogenesis activity when the precursor was ^{14}C -glutamine, and STC1-B decreased when the substrate was ^{14}C -lactate (Schein et al., 2015). These results suggest that in fed state, the effects of STCs on hepatic and renal

gluconeogenesis pathways were to decrease post-absorptive glucose production. In addition, hSTC-1 and hSTC-2 did not alter glycogen synthesis, concentration, and glucose conversion to CO₂ in liver from fed rats. A previous study using 1-[¹⁴C]-2-deoxy-D-glucose demonstrated that hSTC-1 and hSTC-2 in the same concentration used in this study did not modify glucose uptake in liver slices from fed rats (Gonçalves, 2012).

Gluconeogenic activity and PEPCKc gene expression did not increase in liver from the fasting control group when the substrate was ¹⁴C-lactate or ¹⁴C-alanine, despite the reduction in serum glucose levels in rats after 24h without food. On the other hand, glycogen levels and synthesis from ¹⁴C-glucose in the fasting control group decreased markedly after 24h fast, but lactate levels in rat serum did not change. In contrast, ¹⁴C-glucose conversion to ¹⁴CO₂ in the liver increased markedly induced by fasting. An alternative pathway for glucose oxidation in the cytoplasm that employs enzymes different from those of glycolysis is the pentose phosphate pathway, which can operate to oxidize glucose completely to CO₂ and water. The oxidative pentose phosphate pathway produces NADPH, which can be used to maintain cytosolic glutathione (GSH) in its reduced state (anti-oxidant; beneficial effects). Food deprivation increases oxidative stress in rat liver by increasing mitochondrial free radical generation (Vendemiale et al., 2001; Sorensen et al., 2006). The pentose phosphate pathway in fasting rats may be an alternative pathway to reduce the negative effect of oxidative stress without using ATP during a fasting period. Elucidation of this point requires further studies using specific glucose labeled in C-1 and C-6 to explain the utilization of the pentose phosphate pathway as an alternative pathway during 24h fasting in liver from fasting rats.

On the other hand, in fasted animals, both human stanniocalcins increased ^{14}C -glucose synthesis only from ^{14}C -lactate. *In vitro* studies showed that in liver slices from fasting rats (24h or 48h), gluconeogenesis activity from L-lactate was about 50% higher than from alanine (Ross et al., 1967; Sumida et al., 2002). Furthermore, in mice, a significant increase in the monocarboxylate transporter 2 (MCT2) expression in hepatic tissue was found after fasting (Schutkowski et al., 2014). This increase in the gluconeogenic activity was accompanied by an increase in mRNA levels of *Pck1*, suggesting a transcriptional effect of hSTC-1 and hSTC-2. Although in the fasting group, hSTC-1 increased *Pck1* mRNA levels by 25%, this value did not attain statistical significance. There are reasons to suppose that the substrate's type (L-alanine or L-lactate) and the hormonal and metabolic patterns in fed or fasting rats also modulate human stanniocalcins effects on hepatic gluconeogenesis. In addition, fasting rats showed a lactate:glucose ratio of 1.11. One role of gluconeogenesis from lactate is to maintain acid-base balance, since in the formation of lactate protons are also formed, and transcriptional conversion of lactate to glucose in liver utilizes these protons. If gluconeogenesis is unable to remove the lactic acid produced by peripheral tissues, the dangerous condition of lactic acidosis may result. It has been postulated that STC-1 and STC-2 play an important role in the cellular response capacity to stress (Zhang et al. 2000; Zeiger et al. 2011), and high levels of plasmatic lactate create a stressful situation. Thus an increase in the gluconeogenic pathway from ^{14}C -lactate is a metabolic strategy favorable to raise hepatic lactate clearance. The role of STC-1 on the hepatic gluconeogenic pathway was demonstrated in liver of teleost fish (Palma et al., 2019), suggesting a degree of conservation of STC-1 function in glucose metabolism from fish to mammals. Moreover, in the fasting state, the expression of *Stc1* and *Stc2* in rat liver increased markedly, confirming the participation of these hormones in the hepatic

metabolic regulation in response to the 24-hour fast, possibly coordinating the physiological processes in response to alimentary restriction. Similar results were found in rat brown adipose tissue, which presented higher expression of *Stc1* and *Stc2* genes in fasted states (Sarapio et al., 2019a).

On the other hand, in the fasting state both human stanniocalcins were not able to alter glycogen concentration and synthesis from ^{14}C -glucose, as well as ^{14}C -oxidation in liver. In contrast, in brown adipose tissue, hSTC-1 in the same concentration used in this study increased ^{14}C -glucose oxidation and ATP concentration (Cozer et. al., 2017; Sarapio et al., 2019a).

5. Conclusion

The results from this study show an increase in *Stc1* and *Stc2* gene expression in liver from fasting rats, thus confirming the participation of these hormones in cellular response to food restriction stress in vertebrates. As in fish, STC-1 also participates in regulation of the hepatic gluconeogenic pathway in rats when the precursor was ^{14}C -lactate, suggesting the participation of this hormone in lactate homeostasis. Moreover, STC-2 demonstrates opposite signaling on rat hepatic gluconeogenesis activity, with *Pck1* gene expression decreasing in the fed state when the substrate was ^{14}C -alanine and increasing during fasting when the substrate was ^{14}C -lactate. In rat liver, the stanniocalcins effects on hepatic gluconeogenesis depend on fed or fasting hormonal and metabolic patterns of the animal and the precursor of the pathway used. However, stanniocalcins in the concentrations used in this study do not affect glycogen concentration and synthesis from ^{14}C -glucose, or ^{14}C -glucose conversion to $^{14}\text{CO}_2$ in livers from fed or fasting rats. These findings highlight the role of stanniocalcins in the

hepatic gluconeogenesis pathway in mammals and confirm our hypothesis of conservation of STC-1 and STC-2 functions in carbohydrate metabolism in vertebrates.

Acknowledgments

We thank the Postgraduate Program in Biological Science: Physiology, Department of Physiology, Institute of Health Basic Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul for providing technical support. The authors thank Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Junior by the gentle supply of labeled glucose. RSMS is a PQ-CNPq fellow. SKS, ES, ELV, DSR, RBF and JFAM are Doctoral CNPq fellows, and MVL is graduate CNPq fellow. VS is a Postdoctoral PNPD-CAPES fellow.

Table 1. Serum glucose and lactate concentrations in fed and fasted rats.

	Serum concentrations		<i>N</i>
	Glucose (mmol.L ⁻¹)	Lactate (mmol.L ⁻¹)	
Fed	5.77 ± 0.22	3.16 ± 0.18	8
Fasted	2.92 ± 0.22*	3.23 ± 0.28	8

The results are presented as mean ± SEM. * $P < 0.05$ fed vs fasted group (fasted effect).

Table 2. Effect of hSTC-1 and hSTC-2 on glycogen concentration in liver of fed and fasted rats incubated in presence of 5mM of alanine or 5mM of L-lactate.

Incubation medium		Glycogen (mg.g ⁻¹ of tissue)				
		Control	hSTC-1		hSTC-2	
			3.86 pM	38.6 pM	3.86 pM	38.6 pM
Fed	Alanine 5mM	1.70 ± 0.14 [*]	1.21 ± 0.24 [*]	1.65 ± 0.16 [*]	1.59 ± 0.16 [*]	1.72 ± 0.19 [*]
Fasted	Alanine 5mM	0.019 ± 0.001	0.016 ± 0.002	0.016 ± 0.003	0.012 ± 0.002	0.014 ± 0.007
Fed	Lactate 5mM	1.46 ± 0.17 [#]	1.13 ± 0.23 [#]	1.56 ± 0.09 [#]	1.58 ± 0.11 [#]	1.31 ± 0.17 [#]
Fasted	Lactate 5mM	0.014 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.019 ± 0.005	0.016 ± 0.003

The results are presented as mean ± SEM, n = 6–7 in each group. ^{*} $P < 0.0001$ fed vs fasted group incubated with L-alanine (fasted effect). [#] $P < 0.0001$ fed vs fasted group incubated with L-lactate (fasted effect). hSTC-1, human stanniocalcin-1; hSTC-2, human stanniocalcin-2.

Captions

Fig.1 - RNAm levels of *Stc1* and *Stc2* in liver tissue of fed and fasted (24h) rats. The bars represent means \pm SEM, n=5 per group. ^a $P < 0.001$ *Stc1* vs *Stc2* fed groups; * $P < 0.0001$ *Stc1* and *Stc2* fed vs fasted group; *Stc1*, stanniocalcin-1 gene; *Stc2*, stanniocalcin-2 gene.

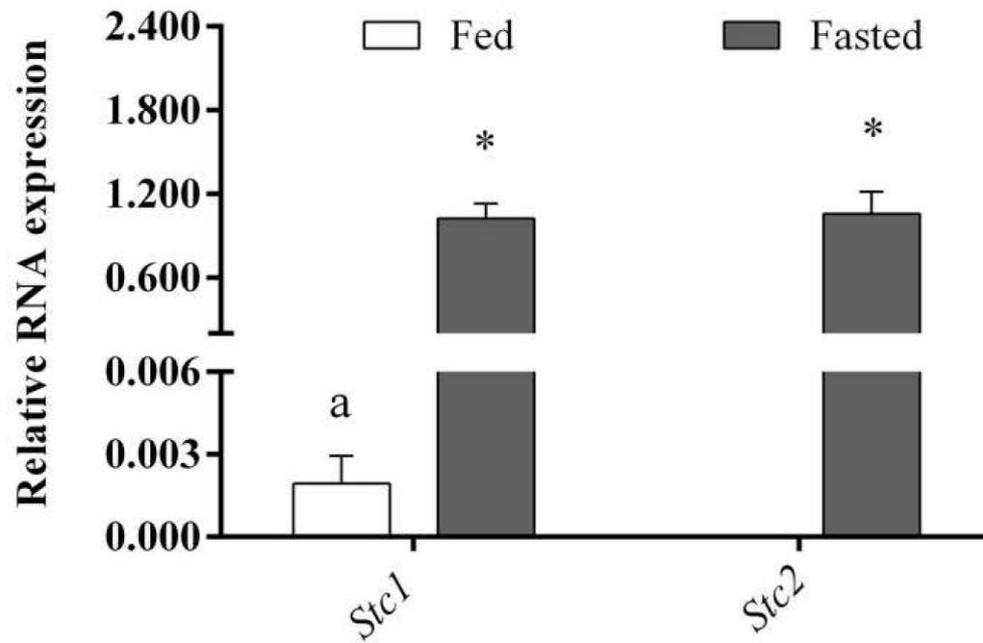
Fig.2 - Effects of hSTC-1 (A) and hSTC-2 (B) on gluconeogenesis from L-[U-¹⁴C]-alanine in liver of fed and fasted (24h) rats. Bars represent means \pm SEM, n = 6-12; * $P < 0.05$, hSTC-1 or hSTC-2 vs. respective control group (hormone effect); hSTC-1, human stanniocalcin-1; hSTC-2, human stanniocalcin-2. Inset plot represent the effect of hSTC-2 (3.86 and 38.6pM) on RNAm levels of *Pck1* (phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic) in liver of fed rats (C). Bars represent means \pm SEM, n=3 - 5. * $P < 0.05$ vs. control group.

Fig.3 - Effects of hSTC-1 (A) and hSTC-2 (B) on gluconeogenesis from L-[U-¹⁴C]-lactate in liver of fed and fasted (24h) rats. Bars represent means \pm SEM, n = 6-12; * $P < 0.05$, hSTC-1 or hSTC-2 vs. respective control group (hormone effect); hSTC-1, human stanniocalcin-1; hSTC-2, human stanniocalcin-2. Overlapping graphics represent the effect of hSTC-1 (C) and hSTC-2 (D) (3.86 and 38.6pM) on RNAm levels of *Pck1* (phosphoenolpyruvate carboxykinase cytosolic) in liver of fasted rats. Bars represent means \pm SEM, n=3 - 5. * $P < 0.05$, hSTC-1 or hSTC-2 vs control group (hormone effect).

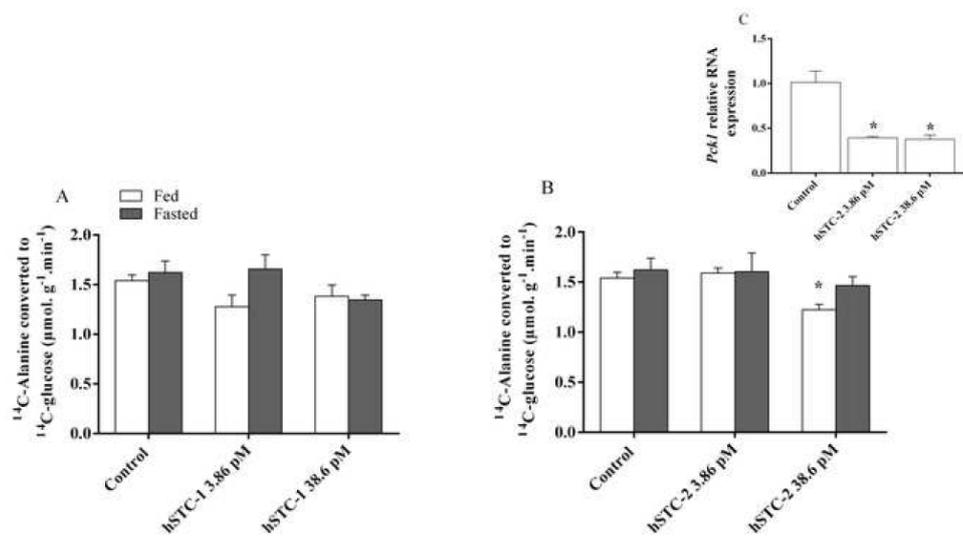
Fig.4 - Effects of hSTC-1 (A) and hSTC-2 (B) on the [U-¹⁴C]-glucose incorporation into ¹⁴CO₂ in liver of fed and fasted rats. The bars represent means \pm SEM, n = 6-7 # $P < 0.001$ fed vs fasting rats (fasting effect); hSTC-1, human stanniocalcin-1; hSTC-2, human stanniocalcin-2.

Fig.5 - Effects of hSTC-1 (A) and hSTC-2 (B) on the [U-¹⁴C]-glucose into glycogen in liver of fed and fasted rats. The bars represent means \pm SEM, n = 6 - 7 in each group; # $P < 0.0001$ difference between fed and fasted (fasted effect). hSTC-1, human stanniocalcin-1; hSTC-2, human stanniocalcin-2.

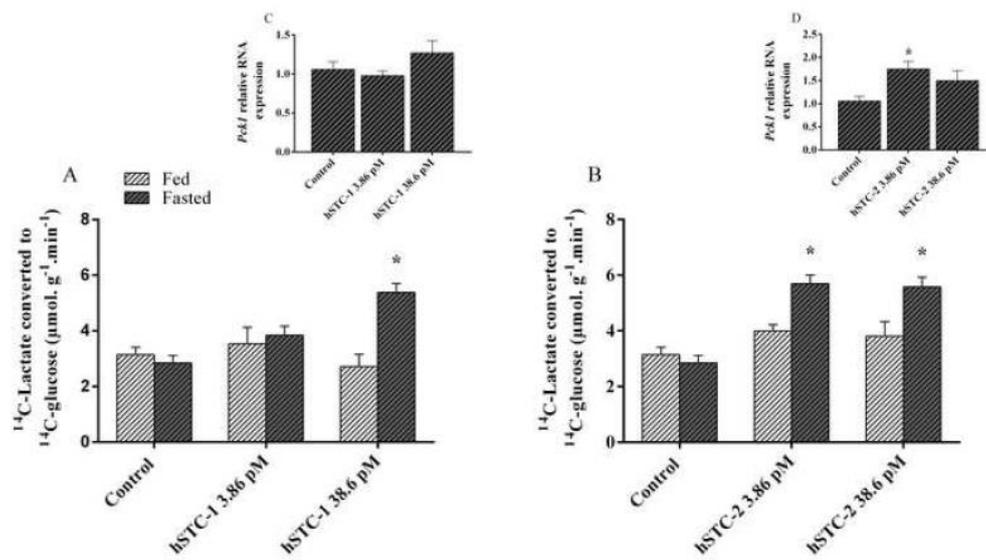
Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig.1.jpg](#)

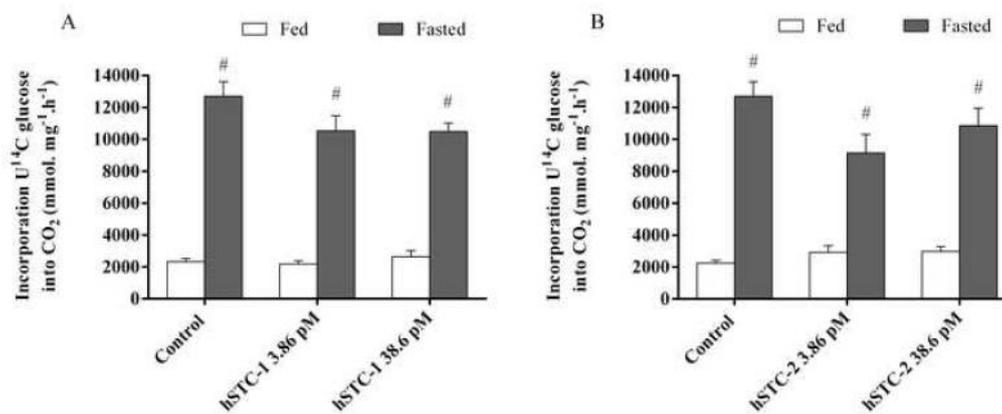
Figure

[Click here to access/download;Figure;New Fig.2.jpg](#)

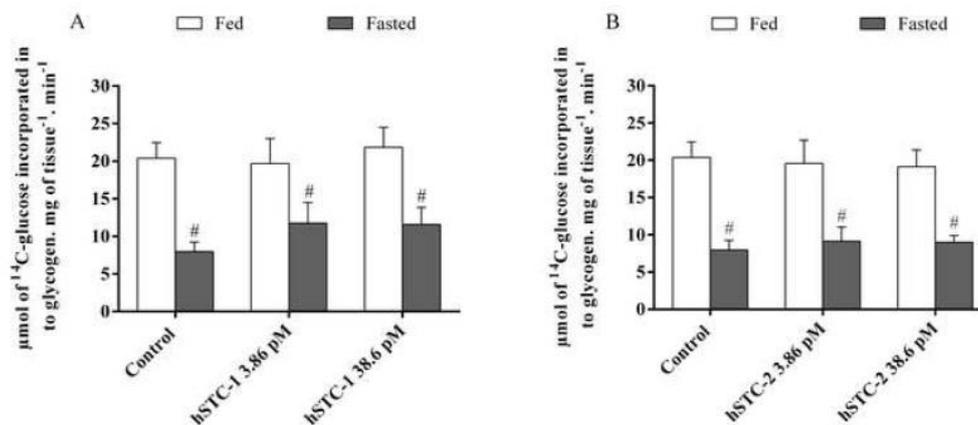
Figure

[Click here to access/download;Figure;New Fig.3.jpg](#)

Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig.4.jpg](#)

Figure

[Click here to access/download;Figure;Fig.5.jpg](#)

Author Statement

Author Statement

The deadline for sending the revised manuscript is July 13, 2020.

5. DISCUSSÃO

5.1 Efeito da hSTC-1 sobre o metabolismo do lactato no córtex e na medula renal de ratos alimentados e jejuados por 48h

O rim contribui para a homeostase da glicose através dos processos de gliconeogênese, de filtração, de reabsorção e de consumo de glicose, sendo o túbulo proximal o único segmento do néfron que contém as enzimas gliconeogênicas (MATHER & POLLOCK, 2011). O túbulo proximal possui 3

segmentos distintos (S1, S2 e S3) cujas contribuições individuais para a síntese de glicose sob várias condições experimentais podem ser muito diferentes (CONJARD et al., 2001). Em humanos, os segmentos S2 e S3 do túbulo proximal sintetizam mais glicose para a mesma concentração de lactato que o segmento S1 (CONJARD et al., 2001; MATHER & POLLOCK, 2011). No período pós-absortivo, a glicose produzida via gliconeogênese renal é quase igual aquela do fígado. Sob condições de jejum curto, 75-80% de glicose que entra na circulação é do fígado e os 20 a 25% restantes são oriundas dos rins (ALSAHLI & GERICH, 2017). Com prolongamento do jejum, os estoques de glicogênio hepático são reduzidos, após 48 h, praticamente toda a glicose que entra na circulação se deve a gliconeogênese e a proporção de glicose sintetizada via gliconeogênese renal aumenta (ALSAHLI & GERICH, 2017). O lactato, a glutamina e o glicerol são os principais precursores da gliconeogênese renal em humanos. O rim e o fígado diferem no uso dos precursores: o lactato é o principal precursor para ambos os órgãos e a glutamina é usada, preferencialmente, pelo rim e a alanina pelo fígado (ALSAHLI & GERICH, 2017). A PEPCK é a enzima responsável por converter o oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, regulando a via gliconeogênica (CRONIGER et al., 2002). Existem duas isoformas de PEPCK nas células dos túbulos renais: o gene *Pck1* codifica a isoforma citosólica, também conhecida como PEPCKc, o gene *Pck2* codifica a isoforma mitocondrial (PEPCKm) (BEALE et al., 2007; GRASMANN et al., 2019).

Em mamíferos, as catecolaminas, os glicocorticoides, o hormônio da paratireoide, entre outros hormônios, aumentam a atividade da gliconeogênese renal através do CREB, o qual estimula a síntese e a atividade das enzimas da

via gliconeogênica e indiretamente aumenta a disponibilidade de precursores e estimuladores para esta via metabólica (STUMVOLL et al., 1997; ALSAHLI & GERICH, 2017; SWE et al., 2019). A incubação do córtex e da medula renal em presença de FK, na concentração de 25 μ M, acrescido de IBMX, na concentração de 2mM, aumentou a síntese de glicose somente no córtex renal; confirmando a mediação do cAMP na estimulação da via gliconeogênica em ratos alimentados (CONJARD et al., 2001; ALSAHLI & GERICH, 2017; SWE et al., 2019). Entretanto, no córtex renal, a adição de hSTC-1 (3,86pM) ao meio de incubação, diminuiu a atividade gliconeogênica estimulada pelo aumento da concentração intracelular de cAMP induzido pela FK mais IBMX. Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por LUO et al. (2004) em cultura de células de granulosa de ratos, obtidas a partir de folículos antrais precoces. Os autores constataram que o aumento na produção de cAMP estimulado pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) foi suprimido (30%), quando as células foram pré-tratadas com hormônio folículo-estimulante (FSH) mais STC-1 em comparação com as células apenas pré-tratadas somente com FSH (LUO et al., 2004). Além disso, estes autores demonstraram que a STC-1 age à jusante da via da adenilil-ciclase, suprimindo a biossíntese da progesterona em cultura de células granulosas de ratos (LUO et al., 2004). Recentemente, TERRA et al. (2015) demonstraram, *in vitro*, em células HEK293 que a STC-1 inibiu o acúmulo de cAMP induzido pela FK. No presente estudo, a hSTC-1 foi incubada junto com a FK e o IBMX e como sugerido por TERRA et al. (2015) este hormônio impede o aumento da atividade gliconeogênica induzida pelo aumento do cAMP, mantendo a atividade gliconeogênica no córtex renal semelhante àquela do grupo controle. A ligação

do hSTC-1 a os sítios de ligação no córtex renal controla a concentração intracelular de cAMP, regulando a via a jusante da adenilil-ciclase ou aumentando a atividade da fosfodiesterase. Para elucidar estas hipóteses são necessários estudos moleculares e bioquímicos mais aprofundados sobre os efeitos da hSTC-1 sobre o controle da via a jusante da adenilil-ciclase, a expressão gênica e a atividade da fosfodiesterase. Por outro lado, na medula renal de ratos alimentados, o aumento dos níveis de cAMP induzidos por 25 μ M de FK e 2mM de IBMX não alteraram de forma significativa a atividade gliconeogênica a partir de 14 C-lactato, assim como a hSTC-1 (3,86pM). O segmento S3 do túbulo proximal está localizado na porção mais externa da medula renal e em nefros de ratos a síntese de glicose a partir de diferentes precursores diminui progressivamente dos segmentos S1 para S2 e para S3 (YAMADA et al., 1996). O segmento S3 parece ser menos sensível ao aumento intracelular do cAMP ou o controle é feito por outra via, por exemplo, modificação intracelular dos níveis de cálcio. Porém, estes achados estão de acordo com os resultados de SCHEIN et al. (2015) que demonstram que hSTC-1 (3.38pM) não afetou a capacidade gliconeogênica a partir de 14 C-lactato na medula renal de ratos alimentados. Em contraste, quando 30 μ M de FK mais 2mM de IBMX foram adicionados ao meio de incubação a atividade da gliconeogênese a partir de 14 C-lactato na medula renal de ratos alimentados diminuiu cerca de 50%. Em túbulos proximais humanos isolados, altas (1000 μ M) concentrações cAMP reduziram significativamente a atividade gliconeogênica a partir de 14 C-lactato quando comparada às concentrações de 10 e 100 μ M de cAMP (CONJARD et al., 2001).

A FK e o IBMX, na concentração de 25 μ M de FK e 2mM, diminuíram em 30% a oxidação de 14 C-lactato tanto no córtex como na medula renal, mas a hSTC-1 na concentração de 3,86pM não alterou este resultado. Os resultados demonstram que o aumento na concentração intracelular de cAMP estimulou, no córtex renal de ratos alimentados, a incorporação de 14 C-lactato em 14 C-glicose. Assim, um desvio do 14 C-lactato para a via gliconeogênica diminuiria a capacidade de oxidação deste substrato no rim. Além disso, os túbulos proximais necessitam de ATP para o transporte de íons e dependem do metabolismo aeróbico. Esses ratos eram alimentados e sabe-se que os ácidos graxos são a principal fonte de energia para os túbulos proximais, pois mais ATP pode ser produzido a partir de uma molécula de palmitato que a partir de uma molécula de glicose ou de lactato (BHARGAVA & SCHNELLMANN, 2017).

A contribuição do lactato para a produção de glicose na gliconeogênese renal é bastante elevada, cerca de 60%, a glutamina contribui com 20% (ALSAHLI & GERICH, 2017; SWE et al., 2019). No córtex renal de ratos alimentados, a hSTC-1 aumentou a atividade gliconeogênica a partir de 14 C-lactato somente na concentração de 3860pM. Entretanto, as concentrações mais baixas de hSTC-1 (0,386; 3,86 e 386pM) não alteraram, significativamente, a atividade desta via no córtex renal. Este aumento na atividade gliconeogênica, estimulado por 3860pM de hSTC-1, foi acompanhado por incremento na expressão do gene da *Pck1* no córtex renal. A presença de sítios de ligação para a STC-1 na membrana mitocondrial e a evidência de efeitos diretos deste hormônio sobre o metabolismo mitocondrial sugere que a STC-1 seria um dos fatores controladores da gliconeogênese renal a partir de lactato, mas somente em concentrações elevadas (MCCUDDEN et al., 2002;

SCHEIN et al., 2015; ELLARD et al., 2007). Do ponto de vista fisiológico, a estimulação da atividade gliconeogênica, a partir de ^{14}C -lactato induzida por altas concentrações de hSTC-1 no córtex renal de animais alimentados, aumentaria a produção de glicose, especialmente, em pacientes com diabetes tipo 2, que apresentam maior atividade gliconeogênica hepática associada à alta atividade da enzima PEPCK, contribuindo, assim, para uma hiperglicemia no estado alimentado (MATHER & POLLOCK, 2011; ALSAHLI & GERICH, 2017; SWE et al., 2019). Entretanto, na medula renal de ratos alimentados, a hSTC-1 nas concentrações utilizadas neste estudo não afetaram a atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato. Estudos prévios, mostraram que 3,86pM de hSTC-1 diminuíram a atividade gliconeogênica renal na medula renal quando o precursor era ^{14}C -glutamina (SCHEIN et al., 2015). Em ratos submetidos à privação de água, a expressão gênica da STC-1 nas regiões cortical e medular renal respondem de maneira diferente (TURNER et al., 2011). Estes achados sugerem que nos túbulos proximal renal de ratos alimentados, os efeitos da hSTC-1 sobre a via gliconeogênica dependem do tipo de precursor (L-glutamina ou L-lactato), da concentração do hormônio e da estrutura renal: córtex ou medula.

Na condição pós-absortiva, 75–80% da glicose liberada para a circulação são provenientes do fígado e os outros 20–25% são oriundos do rim. Em ratos, o jejum de 24 ou de 48h diminuiu marcadamente a concentração de glicogênio no fígado e os níveis de glicose no plasma (De SOUZA et al., 2020a), mas aumentou 65% a concentração de lactato no plasma (SARAPIO et al., 2019). Entretanto, a atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato no córtex renal de ratos do grupo controle jejuado foi similar àquela dos animais

do grupo controle alimentado. Este achado é consistente com os resultados de aumento da oxidação de ^{14}C -lactato verificada no córtex renal do grupo controle jejum, provavelmente, para fornecer energia e NADH para a gliconeogênese renal. Nos ratos em jejum, a hSTC-1 não alterou a atividade gliconeogênica no córtex renal a partir do ^{14}C -lactato; contudo este hormônio aumentou marcadamente a gliconeogênese hepática a partir de ^{14}C -lactato nos ratos em jejum (De SOUZA et al., 2020b).

Por outro lado, na medula renal do grupo controle jejuado, a capacidade gliconeogênica tendo o ^{14}C -lactato como precursor diminuiu cerca de 32% quando comparada àquela dos ratos alimentados. Após 48h de restrição alimentar, o suprimento de glicose para a medula externa é limitado neste grupo controle, podendo ocorrer uma diminuição na concentração de ATP necessária para manter a atividade da gliconeogênese. Entretanto, na medula renal de ratos em jejum, a hSTC-1 na concentração de 3,86pM aumentou 32% a capacidade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato, porém este aumento não foi acompanhado de um aumento na expressão do gene *Pck1*. Estes resultados são coerentes com a presença de sítios de ligação para STC-1 e altos níveis de STC-1 imunorreativa no segmento S3 dos túbulos proximais renais de ratos (HADDAD et al., 1996; WONG et al., 1998; MCCUDDEN et al., 2002; JAMES et al., 2005). Na medula renal de animais em jejum (48h), a hSTC-1 aumentando a capacidade de síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -lactato contribui para a homeostase do lactato, impedindo a condição perigosa da acidose láctica e fornecendo glicose para outros tecidos.

Os ratos alimentados foram mantidos com ração até o momento do experimento. A homeostase da glicose nesses animais foi mantida

principalmente pela reabsorção renal e pela absorção intestinal de glicose que aumentaram os níveis circulantes desta hexose e do hormônio insulina (SARAPIO et al, 2019). O aumento da oxidação de ^{14}C -lactato, estimulado por 0,386 pM de hSTC-1 no córtex renal de ratos alimentados, sugere um desvio do lactato da via gliconeogênica para a síntese de ATP com o objetivo de aumentar as fontes de energia neste tecido. No córtex renal, os túbulos proximais dependem da eficiência da fosforilação oxidativa para produzir ATP que impulsiona o transporte ativo de glicose, íons e nutrientes (BHARGAVA & SCHNELLMANN, 2017). Devido à alta demanda de energia dos túbulos proximais, o metabolismo aeróbico é o principal mecanismo de produção de ATP. Nos ratos em jejum, a hSTC-1, nas concentrações utilizadas neste estudo, não afetou a oxidação do ^{14}C -lactato no córtex renal. No entanto, nesses animais a hSTC-1 aumentou a produção de ^{14}C -glicose a partir do ^{14}C -lactato, sugerindo um desvio do ^{14}C -lactato da via oxidativa à via gliconeogênica. A comparação entre a oxidação do ^{14}C -lactato no córtex e na medula nos grupos controle alimentado e controle jejum mostra que a medula renal possui elevada capacidade de oxidação, mas o hSTC-1 não afetou essa via em ambos os grupos.

Nossos resultados demonstram o papel da hSTC-1 no metabolismo do lactato no córtex renal e na medula de ratos alimentados e em jejum. No córtex renal, a hSTC-1 em dose elevada aumentou a atividade gliconeogênica no estado alimentado, induzida pelo aumento da expressão do gene *Pck1*. Em animais em jejum, a hSTC-1 aumentou a atividade gliconeogênica da medula renal, mas a expressão do gene *Pck1* não foi alterada. O efeito estimulador da hSTC-1 sobre a oxidação do ^{14}C -lactato ocorreu apenas no córtex renal de

ratos alimentados. Esses achados mostram a contribuição da hSTC-1 para a homeostase do lactato. Essa resposta pode representar uma estratégia de ação da STC-1 em resposta ao estresse de jejum. Por outro lado, a hSTC-1 atua a jusante da via da adenilil-ciclase, diminuindo a atividade gliconeogênica induzida pelo aumento intracelular do cAMP ou estimulando a atividade da fosfodiesterase no córtex renal. No entanto, não foi encontrado efeito da hSTC-1 sobre a oxidação de ^{14}C -lactato após aumento no cAMP intracelular. Os resultados também revelaram que o córtex renal e a medula respondem diferentemente à hSTC-1, possivelmente, devido à maior expressão do gene STC-1 na medula renal interna do que no córtex renal.

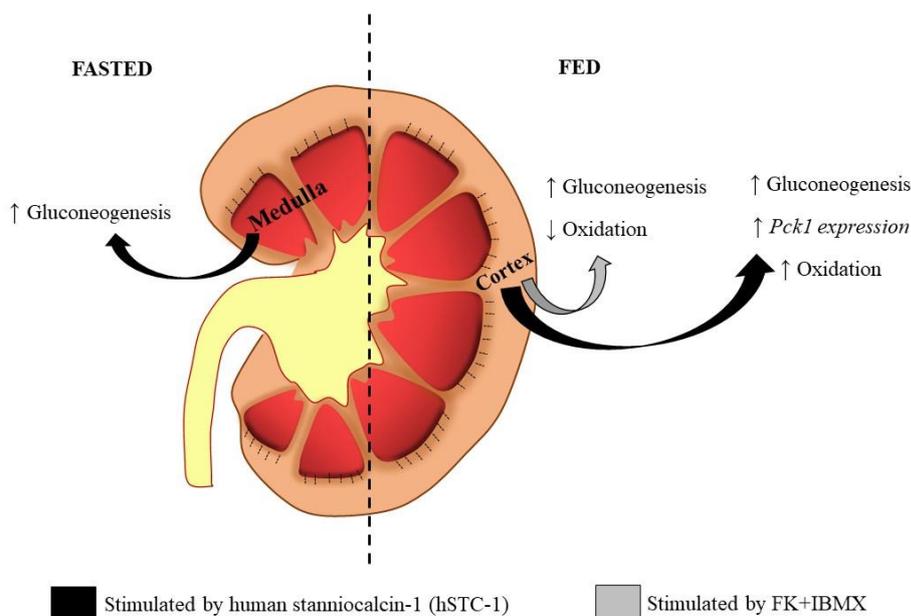


Figura 7: Resumo esquemático do artigo 1. Efeitos da hSTC-1 ou do FK+IBMX sobre o fluxo do lactato na oxidação e na gliconeogênese renal de ratos alimentados ou submetidos ao jejum de 48h. Linha tracejada delimita os principais eventos identificados no estado alimentado e no jejum. Setas na cor preta, efeito da hSTC-1; seta na cor cinza, efeito FK+IBMX. *Pck1*, gene da PEPCCKc.

5.2 Efeito da hSTC-1 e da hSTC-2 sobre a gliconeogênese hepática em ratos alimentados e em jejum de 24h

O conhecimento do papel fisiológico dos hormônios stanniocalcinas na homeostase da glicose em mamíferos ainda precisa de esclarecimento, pois pouco se conhece dos efeitos destes hormônios sobre o controle do metabolismo intermediário nesta classe de vertebrados.

O fígado é um importante órgão metabólico responsável por cerca de 80% da produção endógena de glicose em mamíferos (GERICH, 2010). As vias glicogenólise e gliconeogênese hepática são reguladas por nutrientes, exercício físico, sistema nervoso autônomo, hormônios e diferentes tipos de estresse (PETERSEN et al., 2017). O presente estudo é o primeiro que demonstra o efeito dos hormônios stanniocalcinas (hSTC-1 e hSTC-2) sobre a homeostase da glicose em fígado de ratos alimentados e em jejum de 24h.

No estado alimentado a expressão do gene *Stc1* no fígado sugere o envolvimento deste hormônio no controle metabólico deste órgão. Contudo, em ratos alimentados a expressão do gene *Stc2* no fígado é quase indetectável, mas este resultado está de acordo com os achados de outros investigadores que também constataram níveis de mRNA da proteína STC-2 muito baixos em fígado de ratos (CHANG et al., 1995; CHANG & REDDEL, 1998; ISHIBASHI et al., 1998; VARGHESE et al., 1998).

No grupo controle alimentado, a capacidade de síntese de glicose a partir de ^{14}C -lactato foi significativamente maior quando comparada com a ^{14}C -alanina. Este achado sugere que uma porcentagem da alanina no fígado pode ter se convertido em lactato ao invés de piruvato, diminuindo a incorporação da

^{14}C -alanine em ^{14}C -glicose (ADEVA-ANDANY, 2014). Os resultados mostram que em ratos alimentados a hSTC-1 não altera a capacidade gliconeogênica hepática a partir de ^{14}C -lactato ou ^{14}C -alanina. Entretanto, a hSTC-1 diminuiu marcadamente a capacidade gliconeogênica na medula renal de ratos alimentados, quando o substrato era a ^{14}C -glutamina (SCHEIN et al., 2015). Além disso, este hormônio reduziu a atividade da PEPCKm e a expressão do gene da *Pck2* na medula renal de ratos alimentados (SCHEIN et al., 2015). Por outro lado, a STC-1A de peixe aumenta de forma significativa a atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -glutamina no rim do peixe badejo *Dicentrarchus labrax* (SCHEIN et al., 2015). Na mesma espécie de peixe, a STC-1 estimulou a gliconeogênese hepática a partir de diferentes substratos (PALMA et al., 2019). Esses dados sugerem a existência, entre os vertebrados, de diferenças no efeito da STC-1 sobre a via gliconeogênica: em ratos alimentados a STC-1 diminui a atividade da via gliconeogênica renal quando o substrato é ^{14}C -glutamina (SCHEIN et al., 2015) e não afeta a capacidade gliconeogênica hepática quando o substrato é ^{14}C -alanina ou ^{14}C -lactato. Em peixes, a STC-1 aumenta a atividade gliconeogênica: no fígado a partir de diferentes substratos e no rim a partir de ^{14}C -glutamina (SCHEIN et al., 2015; PALMA et al., 2019). No entanto, a hSTC-2 diminuiu 60% a expressão do gene *Pck1* no fígado de ratos alimentados, induzindo uma redução significativa da atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -alanina. Diversos estudos demonstraram que a enzima PEPCKc pode ser regulada aos níveis transcricional e translacional (STARK et al., 2009; YANG et al., 2009). Neste estudo, o hormônio hSTC-2 regulou a PEPCKc no fígado de ratos alimentados ao nível transcricional. Além disso, no fígado de ratos alimentados a hSTC-2 também reduziu a atividade da

enzima malatodesidrogenase (MDH) (ROSSETTI, 2013), diminuindo a redução de oxaloacetato a malato, reduzindo a capacidade gliconeogênica. Assim, pode-se afirmar que a hSTC-2 controla a atividade gliconeogênica hepática em ratos alimentados a partir de ^{14}C -alanina, regulando a expressão do gene da PEPCKc e a formação de malato na mitocôndria (ROSSETTI, 2013). Estudo em fibroblastos murinos embrionários demonstram que a STC-2 regula de forma negativa o mecanismo molecular de SOCE (store-operated calcium entry) (ZEIGER et al., 2011). A STC-2 interage com o STIM1 (calcium sensor stromal interaction molecule 1) no retículo endoplasmático, reduzindo os níveis intracelulares de cálcio (ZEIGER et al., 2011). Esta redução no cálcio intracelular pode suprimir ou reduzir a capacidade gliconeogênica da mesma forma como a insulina diminui a atividade desta via metabólica (WANG et al., 2012; MATSUMOTO, 2012). A redução na atividade gliconeogênica hepática a partir de ^{14}C -alanina induzida pela hSTC-2 em animais alimentados seria importante para diminuir a produção de glicose endógena, principalmente, em indivíduos com diabetes tipo 2, pois nestes pacientes ocorre um aumento da atividade gliconeogênica hepática e da expressão da enzima PEPCK, contribuindo para o agravamento da hiperglicemia (CRONIGER et al., 2002; RINES et al., 2016).

Por outro lado, quando o substrato utilizado foi ^{14}C -lactato, a hSTC-2 não foi capaz de alterar a atividade gliconeogênica no fígado de ratos alimentados. SCHEIN et al. (2015) encontraram resultados similares em ratos alimentados; a hSTC-1 reduziu a gliconeogênese renal e a expressão do gene da PEPCKm quando o substrato usado foi ^{14}C -glutamina, contudo quando o substrato foi o ^{14}C -lactato, este hormônio não teve efeito na atividade desta via. Os resultados

sugerem que em ratos alimentados o efeito das stanniocalcinas sobre a gliconeogênese hepática seria o de reduzir a produção de glicose no estado pós-absortivo. Entretanto, a hSTC-1 e a hSTC-2 não alteraram nem a concentração e nem a síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -glicose ou a incorporação do ^{14}C da glicose em $^{14}\text{CO}_2$ no fígado de ratos alimentados. Estudo prévio, usando 1- ^{14}C -2-deoxi-D-glicose, demonstrou que a hSTC-1 e a hSTC-2 na mesma concentração usada neste estudo não alterou a captação de glicose no fígado de ratos alimentados (GONÇALVES, 2012).

A atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato ou de ^{14}C -alanina e a expressão do gene da PEPCKc não se alteraram no fígado de ratos em jejum de 24h, apesar da redução significativa dos níveis glicêmicos. Entretanto, os níveis de glicogênio no fígado e a capacidade de síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -glicose em animais do grupo controle diminuíram marcadamente após 24h de jejum, mas os níveis de lactato no plasma não foram alterados pela restrição alimentar. No entanto, a conversão da ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ no fígado do grupo controle em jejum aumentou marcadamente. Uma via alternativa para oxidação da glicose no citoplasma que utiliza enzimas diferentes daquelas da via da glicólise é o ciclo das pentoses, onde a glicose é oxidada completamente a CO_2 e água. Esta via produz NADPH, o qual pode ser utilizado para manter a glutathiona citosólica (GSH) no seu estado reduzido (efeito antioxidante). A restrição alimentar aumenta o estresse oxidativo no fígado de ratos pelo aumento da geração de radicais livres (VENDEMIALE et al., 2001; SORENSEN et al., 2006). A ativação do ciclo das pentoses no fígado de ratos em jejum pode ser uma via alternativa para reduzir o efeito negativo do estresse oxidativo sem utilizar o ATP durante o período de jejum. Contudo, estudos mais

aprofundados utilizando a glicose marcada no C-1 e no C-6 serão necessários para explicar a utilização da via da pentose fosfato como uma via alternativa no fígado de ratos em jejum de 24h.

Por outro lado, em fígado de animais em jejum, as stanniocalcinas humanas aumentaram a síntese de ^{14}C -glicose somente quando o substrato utilizado foi o ^{14}C -lactato. Estudos, *in vitro*, demonstraram em pedaços de fígado de ratos, que no jejum (24 e 48h) a atividade da gliconeogênica a partir de lactato era cerca de 50% maior quando comparada àquela a partir de alanina (ROSS et al., 1967; SUMIDA et al., 2002). Além disso, em ratos em jejum foi constatado um aumento significativo da expressão do transportador de lactato (MCT2) em tecido hepático (SCHUTKOWSKI et al., 2014). Este aumento da atividade gliconeogênica foi acompanhado pela elevação dos níveis de mRNA da *Pck1*, sugerindo um efeito transcricional da hSTC-1 e da hSTC-2. Embora no grupo jejum a hSTC-1 tenha aumentado em 25% os níveis de mRNA da *Pck1*, este valor não foi estatisticamente significativo. Os resultados obtidos sugerem que o tipo de substrato (alanina ou lactato) e o padrão hormonal e metabólico dos ratos alimentados ou em jejum modulam o efeito das stanniocalcinas na via gliconeogênica hepática. Além disso, ratos em jejum possuem uma relação lactato:glicose de 1,11. Uma das funções da gliconeogênese hepática é manter o equilíbrio ácido-básico, uma vez que na formação de lactato, prótons são também formados e a conversão transcricional do lactato em glicose no fígado utiliza estes prótons e caso isto não ocorra a condição de acidose láctica pode ocorrer. Foi sugerido que os hormônios STC-1 e STC-2 têm um papel importante na capacidade de resposta celular ao estresse (ZHANG et al., 2000; ZEIGER et al., 2011) e

elevados níveis de lactato no plasma criam uma situação estressante ao organismo. Assim, o aumento na capacidade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato é uma estratégia metabólica favorável para aumentar a depuração do lactato. O papel da STC-1 sobre a gliconeogênese hepática foi demonstrado em peixe teleósteo (PALMA et al., 2019), sugerindo um grau de conservação da função da STC-1 sobre o metabolismo da glicose do peixe ao mamífero. No jejum, a expressão da *Stc1* e da *Stc2* no fígado de ratos aumentou marcadamente, confirmando a participação destes hormônios na regulação do metabolismo hepático em resposta ao jejum de 24h, possivelmente, coordenando os processos fisiológicos em resposta à restrição alimentar. Resultado semelhante foi encontrado no tecido adiposo marrom de ratos em jejum, que apresentou alta expressão de *Stc1* e de *Stc2* (SARAPIO et al., 2019). Entretanto, no jejum as stanniocalcinas não apresentaram efeito sobre a concentração de glicogênio e sua síntese a partir de ^{14}C -glicose, assim como sobre a oxidação de ^{14}C -glicose no fígado.

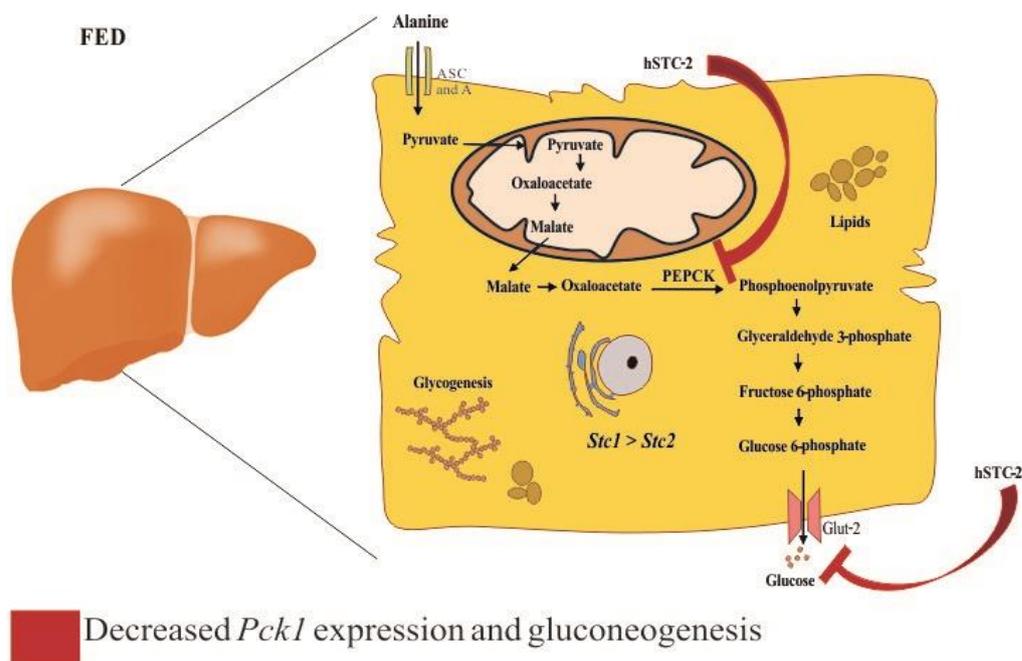


Figura 8: Resumo esquemático do artigo 2. Efeitos da stanniocalcina humana 2 (hSTC-2) sobre o fluxo de alanina na gliconeogênese, assim como na expressão de *Pck1* no fígado de ratos alimentados. Setas vermelhas, efeito inibitório da hSTC-2; ASC and A, transportador sódio-dependente sistema ASC e sistema A; *Pck1*, gene da PEPCK citosólica; Glut2, transportador de glicose tipo 2.

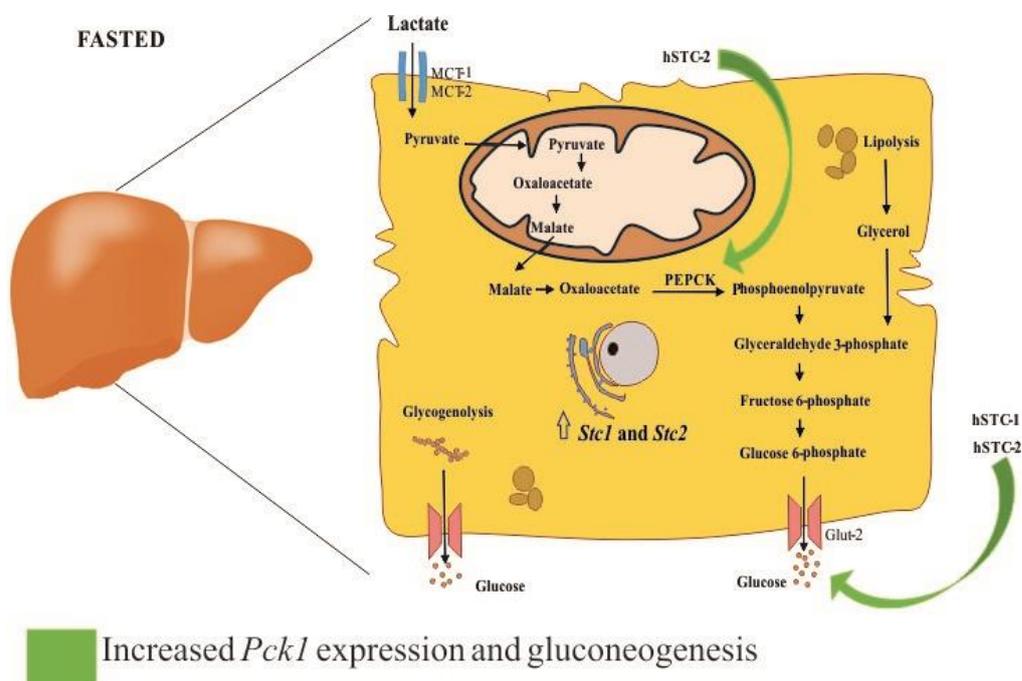


Figura 9: Resumo esquemático do artigo 2. Efeitos da stanniocalcina humana 1 (hSTC-1) ou da stanniocalcina humana 2 (hSTC-2) sobre o fluxo de lactato na gliconeogênese, assim como na expressão de *Pck1* em fígado de ratos submetidos ao jejum de 24h. Setas verdes, efeito estimulatório da hSTC-1 ou da hSTC-2; MCT-1 ou 2, transportadores de monocarboxilato 1 ou 2; *Pck1*, gene da PEPCK citosólica; Glut2, transportador de glicose tipo 2.

6 CONCLUSÕES

Este estudo, *in vitro*, demonstrou pela primeira vez a ação das stanniocalcinas humanas 1 e 2 sobre o metabolismo do fígado e do rim (córtex e medula) em ratos alimentados e submetidos ao jejum. No fígado de ratos alimentados foi constatada somente a expressão do gene da *Stc1*. Entretanto, no jejum de 24h as expressões dos genes das *Stc1* e *Stc2* aumentaram marcadamente no fígado, sugerindo a participação destes hormônios na regulação metabólica do fígado durante o jejum. A hSTC-1 participa da regulação da via gliconeogênica hepática quando o precursor é ^{14}C -lactato. No entanto, a hSTC-2 diminui a atividade gliconeogênica e a expressão do gene *Pck1* no fígado de ratos alimentados incubados com ^{14}C -alanina. Todavia, este hormônio aumenta a atividade gliconeogênica durante o jejum quando o substrato é o ^{14}C -lactato. No fígado de ratos, os efeitos das STCs sobre gliconeogênese hepática dependem do padrão hormonal e metabólico do animal, em jejum ou alimentado, e do precursor da via utilizado. No entanto, as STCs nas concentrações utilizadas neste estudo não afetam a concentração e a síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -glicose ou a oxidação da ^{14}C -glicose nos fígados de ratos alimentados ou em jejum. Esses achados destacam o papel das STCs na regulação da via gliconeogênica hepática em mamíferos.

A hSTC-1 participa da regulação do metabolismo do lactato no córtex renal e na medula de ratos alimentados e em jejum (48h). Este hormônio aumenta a atividade da gliconeogênese no estado alimentado no córtex renal, e esse aumento foi induzido pelo aumento da expressão do gene *Pck1*. Em animais em jejum, o hSTC-1 aumenta a atividade gliconeogênica da medula renal, mas a expressão do gene *Pck1* não foi alterada. O efeito estimulador do

hSTC-1 na oxidação do ^{14}C -lactato ocorreu apenas no córtex renal de ratos alimentados. Esses achados mostram a contribuição do hSTC-1 para a homeostase do lactato, impedindo a perigosa condição da acidose láctica e fornecendo glicose para outros tecidos. Por outro lado, o hSTC-1 atua a jusante da via da adenilil-ciclase, diminuindo a atividade da gliconeogênese induzida pelo aumento intracelular do cAMP ou estimulando a atividade da fosfodiesterase no córtex renal. No entanto, não foi encontrado efeito hSTC-1 na oxidação de ^{14}C -lactato após aumento no cAMP intracelular. Os resultados também revelaram que o córtex e a medula renal respondem diferentemente à hSTC-1, possivelmente, devido ao nível mais alto de expressão do gene da STC-1 na medula renal interna do que no córtex renal.

7 PERSPECTIVAS

Conforme identificado neste estudo, há uma modulação da via gliconeogênica pelos hormônios stanniocalcinas no tecido hepático e renal de ratos. O aumento da atividade gliconeogênica é comum em pacientes diabéticos do tipo 1 e 2, o que contribui para hiperglicemia. Os hormônios stanniocalcinas podem representar uma estratégia terapêutica para prevenir alterações funcionais, bioquímicas e moleculares relacionadas com a hiperglicemia no estado alimentado e em pacientes diabéticos. Com base nessa hipótese, uma das perspectivas do estudo será a utilização ratos diabéticos para avaliar a influência dos hormônios STC-1 e STC-2 sobre a via gliconeogênica. Para tanto, será necessário quantificar os principais hormônios reguladores da via gliconeogênica, como insulina, glucagon e glicocorticóide. Além de analisar os níveis de expressão de distintas enzimas reguladoras e

dos principais fatores de transcrição da via gliconeogênica tais como PEPCKc, frutose 1,6 bifosfatase, glicose 6 fosfatase, CREB e FOXO-1 nos tecidos hepático e renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeva-Andany, M.M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C., Pazos-García, C., 2016. Liver glucose metabolism in humans. *Bioscience Reports* 36, 1–15. <https://doi.org/10.1042/BSR20160385>
- Aires, M. de M., 2012. *Fisiologia*, 4th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Alasbahi, R. H., Melzig, M. F., 2012. Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP. *Pharmazie* 67(1):5-13. Doi:10.1691/ph.2012.1642
- Alsahli, M., Gerich, J.E., 2017. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 133, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.07.033>
- Baverel, G., Ferrier, B., Martin, M., 1995. Fuel selection by the kidney: adaptation to starvation. *Proceedings of the Nutrition Society* 54, 197–212. <https://doi.org/10.1079/pns19950049> cids in normal and tumour tissues. *Biochemical Journal* 31, 1268–1275.
- Beale, E.G., Harvey, B.J., Forest, C., 2007. PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell Biochemistry and Biophysics* 48, 89–95. <https://doi.org/10.1007/s12013-007-0025-6>
- Benoy, M.P., Elliott, K.A.C., 1937. The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumors tissues: synthesis of carbohydrate. 31(8) 1268-1275. <https://doi.org/10.1042/bj0311268>
- Bhargava, P., Schnellmann, R. G., 2017. Mitochondrial Energetics in the Kidney. *Nature Review Nephrology* 13(10), 629-646. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>
- Brantley, K.D., Cronin-fenton, D., Yacoub, R., Lauridsen, K.L., Hamilton-dutoit, S., Lash, T.L., 2018. Stanniocalcin Expression as a Predictor of Late Breast

- Cancer Recurrence. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 6, 653–659. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0905>. Stanniocalcin
- Brooks, G.A., 2018. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metabolism* 27, 757–785. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008>
- Brown, E.T., Umino, Y., Loi, T., Solessio, E., Barlow, R., 2005. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. *Visual Neuroscience* 22, 615–618. <https://doi.org/10.1017/S0952523805225105>
- Bueno, D., Azzolin, I., Perry, M.L.S., 1994. Ontogenetic study of glucose and lactate utilisation by rat cerebellum slices. *Med. Sci. Res.* 22, 631–632.
- Cano, N., 2002. Bench-to-bedside review: Glucose production from the kidney. *Critical Care* 6, 317–321. <https://doi.org/10.1186/cc1517>
- Cersosimo, E., Garlick, P., Ferretti, J., 2000. Renal substrate metabolism and gluconeogenesis during hypoglycemia in humans. *Diabetes* 49, 1186–1193. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.7.1186>
- Chang, A.C.-M., Cha, J., Koentgen, F., Reddel, R.R., 2005. The Murine Stanniocalcin 1 Gene Is Not Essential for Growth and Development. *Molecular and Cellular Biology* 25, 10604–10610. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.23.10604-10610.2005>
- Chang, A.C.M., Jellinek, D.A., Reddel, R.R., 2003. Mammalian stanniocalcins and cancer. *Endocrine-Related Cancer* 10, 359–373. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0100359>
- Chang, A.C.M., Reddel, R.R., 1998. Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: Stanniocalcin 2. *Molecular and Cellular Endocrinology*. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00097-5)
- Chang, A.C.M., Janosi, J., Hulsbeek, M., de Jong, D., Jeffrey, K.J., Noble, J.R., Reddel, R.R., 1995. A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 112, 241–247. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(95\)03601-3](https://doi.org/10.1016/0303-7207(95)03601-3)

- Chang, A.C.M., Hook, J., Lemckert, F.A., McDonald, M.M., Nguyen, M.A.T., Hardeman, E.C., Little, D.G., Gunning, P.W., Reddel, R.R., 2008. The murine stanniocalcin 2 gene is a negative regulator of postnatal growth. *Endocrinology* 149, 2403–2410. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1219>
- Chen, F., Zhang, Z., Pu, F., 2019. Role of stanniocalcin-1 in breast cancer (Review). *Oncology Letters* 18, 3946–3953. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10777>
- Conjard, A., Mireille, M., Jérôme, G., Baverel, G., Ferrier, B., 2001. Gluconeogenesis from glutamine and lactate in the isolated human renal proximal tubule: longitudinal heterogeneity and lack of response to adrenaline. *The Biochemical journal* 377, 371–377. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600371>
- Cozer, A.G., Trapp, M., Vieira Marques, C., Martins, T.L., Model, J.F.A., Schein, V., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2016. Stanniocalcin 1 Enhances Carbon Flux from Glucose to Lipids in White Retroperitoneal Adipose Tissue in the Fed Rat. *Lipids* 51, 1303–1307. <https://doi.org/10.1007/s11745-016-4202-5>
- Cozer, A.G., Trapp, M., Martins, T.L., De Fraga, L.S., Vieira Marques, C., Model, J.F.A., Schein, V., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2017. Effects of Stanniocalcin-1 on glucose flux in rat brown adipose tissue. *Biochimie* 138, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.04.008>
- Croniger, C.M., Olswang, Y., Reshef, L., Kalhan, S.C., Tilghman, S.M., Hanson, R.W., 2002. Mini-Series: Modern Metabolic Concepts Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Revisited. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 30, 14–20.
- De Niu, P., Radman, D.P., Jaworski, E.M., Deol, H., Gentz, R., Su, J., Olsen, H.S., Wagner, G.F., 2000. Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay: Serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology* 162, 131–144. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00199-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00199-4)

- Deol, H.K., Varghese, R., Wagner, G.F., Dimattia, G.E., V, D.B.R., Oncology, G.E.D., Physiology, H.D., 2000. Dynamic Regulation of Mouse Ovarian Stanniocalcin Expression during Gestation and Lactation. *Endocrinology* 141, 3412–3421. <https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7658>
- De Souza, S. K., Sarapio, E., Vogt, E. L., Schein, V., Fabres, R. B., Model, J. F. A., Lima, M. V., Rocha, D. S., Da Silva, R. S. M. Effects of stanniocalcin hormones on rat hepatic glucose homeostasis under fed and fasted conditions. Artigo submetido a revista *General and Comparative Endocrinology* (GCE_2019_498R1). a
- De Souza, S. K., Sarapio, E., Vogt, E. L., Schein, V., Fabres, R. B., Model, J. F. A., Girelli, V., Rocha, D. S., Da Silva, R. S. M. 2020. Effects of stanniocalcin 1 hormone on lactate metabolism in rat kidney under fed and fasted conditions. *Life Science*, v256. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117922>. b
- DiMattia, G.E., Varghese, R., Wagner, G.F., 1998. Molecular cloning and characterization of stanniocalcin-related protein. *Molecular and Cellular Endocrinology* 146, 137–140. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00163-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00163-4)
- Ellard, J.P., McCudden, C.R., Tanega, C., James, K.A., Ratkovic, S., Staples, J.F., Wagner, G.F., 2007. The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells: STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates. *Molecular and Cellular Endocrinology* 264, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.008>
- Fang, Z., Tian, Z., Luo, K., Song, H., Yi, J., 2014. Clinical significance of stanniocalcin expression in tissue and serum of gastric cancer patients. *Chinese Journal of Cancer Research* 26, 602–610. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2014.10.08>

- Filvaroff, E.H., Guillet, S., Zlot, C., Bao, M., Ingle, G., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Bunting, S., Ross, J., Carano, R.A.D., Powell-Braxton, L., Wagner, G.F., Eckert, R., Gerritsen, M.E., French, D.M., 2002. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. *Endocrinology* 143, 3681–3690. <https://doi.org/10.1210/en.2001-211424>
- Gagliardi, A.D., Kuo, E.Y.W., Raulic, S., Wagner, G.F., DiMattia, G.E., 2005. Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 288, 92–105. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00268.2004>
- Gerich, J.E., 2010. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: Therapeutic implications. *Diabetic Medicine*. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x>
- Gonçalves, A. da S., 2012. Efeito dos hormônios peptídicos stanniocalcina 1 e stanniocalcina 2 sobre metabolismo da glicose em ratos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Grasmann, G., Smolle, E., Olschewski, H., Leithner, K., 2019. Gluconeogenesis in cancer cells – Repurposing of a starvation-induced metabolic pathway? *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1872, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.05.006>
- Guder, W.G., Rupperecht, A., 1975. Metabolism of Isolated Kidney Tubules. *European Journal of Biochemistry* 52, 283–290. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb03996.x>
- Haddad, M, S. Roder, H.S. Olsen, G.F. Wagner, Immunocytochemical localization of stanniocalcin cell in the rat kidney, *Endocrinology*. 137 (1996) 2113–2117 <https://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612555>.
- Halestrap, A.P., Wilson, M.C., 2012. The monocarboxylate transporter family- Role and regulation. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.572>

- Ishibashi, K., Miyamoto, K., Taketani, Y., Morita, K., Takeda, E., Sasaki, S., Imai, M., 1998. Molecular cloning of a second human stanniocalcin homologue (STC2). *Biochem Biophys Res Commun.*250, 252-258. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9300>
- Ishibashi, K., Imai, M., 2002. Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals. *American Journal of Physiology- Renal Physiology* 111, 1333–1346. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00364.2000>
- James, K., Seitelbach, M., McCudden, C.R., Wagner, G.F., 2005. Evidence for stanniocalcin binding activity in mammalian blood and glomerular filtrate. *Kidney International* 67, 477–482. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.67104.x>
- Jiao, Y., Zhao, J., Shi, G., Liu, X., Xiong, X., Li, X., Zhang, H., Ma, Q., Lu, Y., 2017. Stanniocalcin2 acts as an anorectic factor through activation of STAT3 pathway. *Oncotarget* 8, 91067–91075. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19412>
- Juhanson, P., Rull, K., Kikas, T., Laivuori, H., Vaas, P., Kajantie, E., Heinonen, S., Laan, M., 2016. Stanniocalcin-1 hormone in nonpreeclamptic and preeclamptic pregnancy: Clinical, life-style, and genetic modulators. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101, 1–10. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1873>
- Kaneko, K., Soty, M., Zitoun, C., Duchamp, A., Silva, M., Philippe, E., Gautier-Stein, A., Rajas, F., Mithieux, G., 2018. The role of kidney in the inter-organ coordination of endogenous glucose production during fasting. *Molecular Metabolism* 16, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.06.010>
- Kowalski, G.M., Bruce, C.R., 2014. The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 307, 859–871. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00165.2014>

- Krebs, H.A., Yoshida, T., 1963. Renal Gluconeogenesis. 2. theGluconeogenic Capacity of the Kidney Cortex of Various Species. *The Biochemical journal* 89, 398–400. <https://doi.org/10.1042/bj0890398>
- Lardizábal, M.N., Nocito, A.L., Daniele, S.M., Ornella, L.A., Palatnik, J.F., Veggi, L.M., 2012. Reference genes for real-time PCR quantification of micromas and messenger RNAs in rat models of hepatotoxicity. *PLoS ONE* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036323>
- Law, A.Y., Wong, C.K., Turner, J., Gonzalez, A.A., Prieto, M.C., Wagner, G.F., 2012. Vasopressin controls stanniocalcin-1 gene expression in rat and mouse kidney. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348, 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.005>
- Li, Y., He, Z.C., Zhang, X.N., Liu, Q., Chen, C., Zhu, Z., Chen, Q., Shi, Y., Yao, X.H., Cui, Y.H., Zhang, X., Wang, Y., Kung, H.F., Ping, Y.F., Bian, X.W., 2018. Stanniocalcin-1 augments stem-like traits of glioblastoma cells through binding and activating NOTCH1. *Cancer Letters* 416, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.033>
- Lopez, J.J., Jard, I., Reyes, M., Jim, F., Hern, J., Mart, M., Luis, G., Jes, A., Delgado, E., Rosado, J.A., Redondo, P.C., 2017. Involvement of stanniocalcins in the deregulation of glycaemia in obese mice and type 2 diabetic patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22, 684–694. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13355>
- Lu, M., Wagner, G.F., Renfro, J.L., 1994. Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 267. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.267.5.r1356>
- Luo, C. W., Kawamura, K., Klein, C., Hsueh, A. J. W., 2004. Paracrine Regulation of Ovarian Granulosa Cell Differentiation by Stanniocalcin (STC) 1: Mediation through Specific STC1 Receptors. *Molecular Endocrinology* 18(8), 2085-2096. <https://doi.org/101210/me.2004-0066>

- MacDonald, Michael; Neufeldt, Naomi; Park, Byung N; Berger, Michael and Ruderman, N., 1976. Alanine metabolism and gluconeogenesis in the rat. *American Journal of Physiology* 231, 619–626.
- Madsen, K.L., Tavernini, M.M., Yachimec, C., Mendrick, D.L., Alfonso, P.J., Buergin, M., Olsen, H.S., Antonaccio, M.J., Thomson, A.B.R., Fedorak, R.N., 1998. Stanniocalcin: A novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 274. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.274.1.g96>
- Mather, A., Pollock, C., 2011. Glucose handling by the kidney. *Kidney international. Supplement* 79, S1–S6. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.509>
- Matsumoto, M., 2012. InsP3R-Ca²⁺ signaling takes center stage in the hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Cell Res.* 22, 1530–1532. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.95>
- McCudden, C.R., James, K.A., Hasilo, C., Wagner, G.F., 2002. Characterization of mammalian stanniocalcin receptors: Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 277, 45249–45258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205954200>
- Meyer, C., Stumvoll, M., Dostou, J., Welle, S., Haymond, M., Gerich, J., 2002. Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 282, 428–434. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00116.2001>
- Moore, E.E., Kuestner, R.E., Conklin, D.C., Whitmore, T.E., Downey, W., Buddle, M.M., Adams, R.L., Bell, L.A., Thompson, D.L., Wolf, A., Chen, L., Stamm, M.R., Grant, F.J., Lok, S., Ren, H., De Jongh, K.S., 1999. Stanniocalcin 2: Characterization of the protein and its localization to human pancreatic alpha cells. *Hormone and Metabolic Research* 31, 406–414. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978764>

- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Princípios de bioquímica de Lehninger*, 6th ed. Artmed Editora, Porto Alegre.
- Olsen, H.S., Cepeda, M.A., Zhang, Q.-Q., Rosen, C.A., Vozzolo, B.L., Wagnert, G.F., 1996. Human stanniocalcin: A possible hormonal regulator of mineral metabolism. *Biochemistry* 93, 1792-1796. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.1792>
- Paciga, M., DiMattia, G.E., Wagner, G.F., 2004. Regulation of luteal cell big stanniocalcin production and secretion. *Endocrinology* 145, 4204–4212. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1613>
- Paciga, M., McCudden, C.R., Londos, C., DiMattia, G.E., Wagner, G.F., 2003. Targeting of big stanniocalcin and its receptor to lipid storage droplets of ovarian steroidogenic cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 49549–49554. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307302200>
- Palma, P.F.S., Bock, C., Silva, S.T., Guerreiro, P.M., Power, D.M., Pörtner, H.O., Canário, A.V.M., 2019. STC1 and PTHrP modify carbohydrate and lipid metabolism in liver of a teleost fish. *Sci. Report.* 723, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36821-2>
- Petersen, M.C., Vatner, D.F., Shulman, G.I., 2017. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease HHS Public Access. *Nat Rev Endocrinol* 13, 572–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
- Rines, A.K., Sharabi, K., Tavares, C.D.J., Puigserver, P., 2016. Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery* 15, 786–804. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.151>
- Rossetti, C.L. 2013. *Ação dos hormônios stanniocalcina 1 e stanniocalcina 2 sobre o metabolismo de aminoácidos em ratos*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- Ross, B.D., Hems, R., Krebs, H. A., 1967. The rate of gluconeogenesis from various precursors in the perfused rat liver. *Biochem. J.* 102, 942-951. <https://doi.org/10.1042/bj1020942>
- Rui, L., 2014. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology* 4, 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- Saha, J.K., Xia, J., Grondin, J.M., Engle, S.K., Jakubowski, J.A., 2005. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: Mechanisms and implications for preclinical models. *Experimental Biology and Medicine* 230, 777–784. <https://doi.org/10.1177/153537020523001012>
- Sarapio, E., Souza, S.K., Vogt, E.L., Rocha, D.S., Fabres, R.B., Trapp, M., Silva, R.S.M. Da, 2019. Effects of stanniocalcin hormones on rat brown adipose tissue metabolism under fed and fasted conditions. *Molecular and Cellular Endocrinology* 485, 81–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.02.004>
- Sazonova, O., James, K.A., McCudden, C.R., Segal, D., Talebian, A., Wagner, G.F., 2008. Stanniocalcin-1 secretion and receptor regulation in kidney cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 294, 788–794. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00553.2007>
- Schein, V., Kucharski, L.C., Guerreiro, P.M.G., Martins, T.L., Morgado, I., Power, D.M., Canario, A.V.M., da Silva, R.S.M., 2015. Stanniocalcin 1 effects on the renal gluconeogenesis pathway in rat and fish. *Molecular and Cellular Endocrinology* 414, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.010>
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schutkowski, A., Wege, N., Stangl, G.I., König, B., 2014. Tissue-specific expression of monocarboxylate transporters during fasting in mice. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112118>

- Sheikh-Hamad, D., Bick, R., Wu, G.-Y., Christensen, B.M., Razeghi, P., Poindexter, B., Taegtmeier, H., Wamsley, A., Padda, R., Entman, M., Nielsen, S., Youker, K., 2003. Stanniocalcin-1 is a naturally occurring L-channel inhibitor in cardiomyocytes: relevance to human heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285, 442–448. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01071.2002>
- Somogyi, M., 1945. A New Reagent for the Determination of Sugars. *The Journal of Biological Chemistry* 160, 61–68.
- Stark, R., Pasquel, F., Turcu, A., Pongratz, R.L., Roden, M., Cline, G.W., Shulman, G.I., Kibbey, R.G., 2009. Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 284, 26578–26590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011775>
- Sorensen, M., Sanz, A., Gómez, J., Pamplona, R., Portero-Otín, M., Gredilla, R., Barja G., 2006. Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria. *Journal Free Radical Research* 40: 339-347 <https://doi.org/10.1080/10715760500250182>
- Stumvoll, M., Perriello, G., Meyer, C., Gerich, J., 1999. Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney International* 55, 778–792. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.055003778.x>
- Sumida, K.D., Crandall, S.C., Chadha, P.L., Qureshi, T., 2002. Hepatic gluconeogenic capacity from various precursors in young versus old rats. *Metabolism*. 51, 876-880. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.33342>
- Svingen, T., Letting, H., Hadrup, N., Hass, U., Vinggaard, A.M., 2015. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ* 3, 1–15. <https://doi.org/10.7717/peerj.855>

- Swe, M.T., Pongchaidecha, A., Chatsudthipong, V., Chattipakorn, V., Lungkaphin, A., 2019. Molecular signaling mechanisms of renal gluconeogenesis in nondiabetic and diabetic conditions. *Journal of Cellular Physiology* 234, 8134–8151. <https://doi.org/10.1002/jcp.27598>.
- Terra, S.R., Cardoso, J.C.R., Félix, R.C., Martins, L.A.M., Souza, D.O.G., Guma, F.C.R., Canário, A.V.M., Schein, V., 2015. STC1 interference on calcitonin family of receptors signaling during osteoblastogenesis via adenylate cyclase inhibition. *Molecular and Cellular Endocrinology* 403, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.010>
- Turner, J., Xiang, V., Feng, Q., Wagner, G.F., 2011. The renal stanniocalcin-1 gene is differentially regulated by hypertonicity and hypovolemia in the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology* (331) 150 – 157. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.09.010>.
- Thomas, J.A., Sciiender, K.K., Larner, J., 1968. A Rapid Filter Paper Assay for UDPglucose-Glycogen Glucosyltransferase, Including an Improved Biosynthesis of UDP-14C-glicoseG. *Analytical Biochemistry* 25, 486–499. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90127-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90127-9)
- Van Hall, G., 2010. Lactato kinetics in human tissues at rest and during exercise. *ActaPhysiologica* 199, 499–508. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02122.x>
- Van Handel, E., 1965. Estimation of Glycogen in Small Amounts of Tissue. *Analytical Biochemistry* 11, 256-265. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90013-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90013-8)
- Varghese, R., Gagliardi, A.D., Bialek, P.E., Yee, S.P., Wagner, G.F., Dimattia, G.E., 2002. Overexpression of human stanniocalcin affects growth and reproduction in transgenic mice. *Endocrinology* 143, 868–876. <https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8671>
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caraceni, P., Caraccio, G., Domenicali, M., Dall'Agata, M., Trevisani, F., Guerrieri, F., Bernardi, M., Altomare, E, 2001.

Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology*, 33, 808–815. doi:10.1053/jhep.2001.23060

Wagner, G. F., and Dimattia, G. E. 2006. The stanniocalcin family of proteins. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*, 305A (9), 769–780. doi:10.1002/jez.a.313

Wagner, G.F., 1994. The molecular biology of the corpuscles of Stannius and regulation of Stanniocalcin gene expression. *Molecular Endocrinology of Fish XIII*, 273–306. [https://doi.org/https://org/10.1016/S1546-5098\(08\)60070-9](https://doi.org/https://org/10.1016/S1546-5098(08)60070-9).

Wagner, G.F., Vozzolo, B.L., Jaworski, E., Haddad, M., Kline, R.L., Olsen, H.S., Rosen, C.A., Davidson, M.B., Renfro, J.L., 1997. Human stanniocalcin inhibits renal phosphate excretion in the rat. *Journal of Bone and Mineral Research* 12, 165–171. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.2.165>

Wang, M., 2005. The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome. *Nutrition and Metabolism* 2, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-3>

Wang, Y., Huang, L., Abdelrahim, M., Cai, Q., Truong, A., 2009. Stanniocalcin-1 suppresses superoxide generation in macrophages through induction of mitochondrial UCP2. *Journal of Leukocyte Biology* 86, 981–988. <https://doi.org/10.1189/jlb.0708454>

Wang, Y., Li, G., Goode, J., Paz, J.C., Ouyang, K., Screatton, R., Fischer, W.H., Chen, J., Tabas, I., Montminy, M., 2012. Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes. *Nature* 485, 128–132. <https://doi.org/10.1038/nature10988>

Woerle, H.J., Meyer, C., Popa, E.M., Cryer, P.E., Gerich, J.E., 2003. Renal compensation for impaired hepatic glucose release during hypoglycemia in type 2 diabetes: Further evidence for hepatorenal reciprocity. *Diabetes* 52, 1386–1392. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.6.1386>

- Wong, C.K.C., Ho, M.A., Wagner, G.F. 1998. The co-localization of stanniocalcin protein, mRNA and kidney cell markers in the rat kidney, *Journal of Endocrinology* 158, 183–189. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1580183>.
- Yamada, H., Seki, G., Taniguchi, S., Uwatoko, S., Nosaka, K., Suzuki, K., Kurokawa, K., 1996. Roles of Ca²⁺ and PKC in regulation in isolated proximal tubules of acid / base transport. *The American Journal of Physiology* 271, 1068-1076. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.5.f1068>
- Yang, J., Kalhan, S.C., Hanson, R.W., 2009. What is the metabolic role of phosphoenolpyruvate carboxykinase? *Journal of Biological Chemistry*. 284, 27025-27029. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.040543>
- Yeung, B.H.Y., Law, A.Y.S., Wong, C.K.C., 2012. Evolution and roles of stanniocalcin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 349, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.007>
- Yoshiko, Y., Aubin, J.E., 2004. Stanniocalcin 1 as a pleiotropic factor in mammals. *Peptides* 25, 1663–1669. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.04.015>
- Zaidi, D., Turner, J.K., Durst, M.A., Wagner, G.F., 2012. Stanniocalcin-1 Co-Localizes with Insulin in the Pancreatic Islets. *ISRN Endocrinology* 2012, 1–6. <https://doi.org/10.5402/2012/834359>
- Zeiger, W., Ito, D., Swetlik, C., Oh-hora, M., Villereal, M.L., Thinakaran, G., 2011. Stanniocalcin 2 Is a Negative Modulator of Store-Operated Calcium Entry. *Molecular and Cellular Biology* 31, 3710–3722. <https://doi.org/10.1128/MCB.05140-11>
- Zhang, K.Z., Lindsberg, P.J., Tatlisumak, T., Kaste, M., Olsen, H.S., Andersson, L.C., 2000. Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3637-3642. <https://doi.org/10.1073/pnas.070045897>

Zhang, L., Yao, W., Xia, J., Wang, T., Huang, F., 2019. Glucagon-induced acetylation of energy-sensing factors in control of hepatic metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms20081885>

Zhao, J., Jiao, Y., Song, Y., Liu, J., Li, X., Zhang, H., Yang, J., Lu, Y., 2018. Stanniocalcin 2 ameliorates hepatosteatosis through activation of STAT3 signaling. *Frontiers in Physiology* 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00873>

ANEXO I - Comprovante de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29392

Título: Estudo da via de sinalização dos hormônios peptídicos stanniocalcina 1 e 2 no túbulo proximal do rim de ratos

Vigência: 01/09/2015 à 31/08/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ROSELIS SILVEIRA MARTINS DA SILVA - coordenador desde 01/09/2015
VANESSA SCHEIN - pesquisador desde 01/09/2015
Samir Khal de Souza - Aluno de Doutorado desde 01/09/2015
TIAGO LEAL MARTINS - Aluno de Especialização desde 01/09/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 29/06/2015 - Sala 330 - Prédio do Anexo I da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 125 Ratos Wistar, Idade de 90 dias, machos, provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 8 de Julho de 2015

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética