

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

Camila Lüdke Rossetti

**AÇÃO DOS HORMÔNIOS STANNIOCALCINA-1 E
STANNIOCALCINA-2 SOBRE O METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
EM RATOS**

Porto Alegre

2013

Camila Lüdke Rossetti

**AÇÃO DOS HORMÔNIOS STANNIOCALCINA-1 E
STANNIOCALCINA-2 SOBRE O METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Vanessa Schein

Porto Alegre

2013

Camila Lüdke Rossetti

AÇÃO DOS HORMÔNIOS STANNIOCALCINA-1 E STANNIOCALCINA-2 SOBRE O
METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de
Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Aprovada em 26/04/2013

Profa. Dra. Poli Mara Spritzer

Departamento de Fisiologia - UFRGS

Profa. Dra. Vera Treis Trindade

Departamento de Bioquímica - UFRGS

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

Departamento de Fisiologia – USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, Profa. Roselis Silveira Martins da Silva, pela acolhida em seu laboratório e pela orientação no Mestrado e na Iniciação Científica. Agradeço também a confiança em mim depositada e a paciência com que todos os ensinamentos foram transmitidos durante esses anos.

À minha co-orientadora, Profa. Vanessa Schein, agradeço por trazer o incrível mundo das stanniocalcinas para o Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada - LaMEC e pelo entusiasmo e motivação transmitidos sobre o assunto.

Ao Prof. Luiz Carlos Kucharski agradeço pela introdução à área da Fisiologia e ao LaMEC. Agradeço, também, pela amizade, pela presença constante, pelas valiosas instruções e pela indispensável atenção a detalhes de técnicas e procedimentos que enriqueceram este trabalho.

Aos colegas do LaMEC, agradeço pelo convívio e amizade durante todos esses anos e pela ajuda durante todas as etapas deste trabalho, especialmente ao Tiago e ao Ricardo, pelos ensinamentos durante os primeiros experimentos e à Ana, à Cláudia, à Elen, à Raquel, à Luana e à Mariana pelo auxílio nos experimentos e pelo apoio moral quando algo não funcionava. Agradeço, especialmente, à minha amiga Aline que foi imprescindível na execução deste trabalho pelos ensinamentos sobre as técnicas, pelo auxílio na execução de todos os experimentos, pelos conselhos e, acima de tudo, pela amizade e companheirismo que tornaram o dia-a-dia no laboratório mais agradável.

Ao Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral – LABIMET pelo empréstimo do banho metabólico, por ceder água Milli-Q e outros tantos reagentes necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Tiago, pela carinhosa paciência e companheirismo durante esses anos.

Aos meus pais, Paulo e Sandra, por terem me incentivado sempre a estudar cada vez mais e terem me apoiado durante a execução desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação, pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro para a participação em congressos.

A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos.

MARCEL PROUST

RESUMO

ROSSETTI, C. L. **Ação dos hormônios Stanniocalcina-1 e Stanniocalcina-2 sobre o metabolismo de aminoácidos em ratos.** 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

As Stanniocalcinas (STC1 e STC2) são hormônios glicoproteicos originalmente encontrados em peixes teleósteos. Em mamíferos, esses hormônios são expressos em uma variedade de tecidos e estão envolvidos em processos como o transporte de cálcio e fosfato pelos rins e intestino, a carcinogênese, a reprodução e o crescimento. Recentemente, foram encontrados efeitos da STC1 e da STC2 no metabolismo intermediário. Sítios de ligação para a STC1 já foram identificados na membrana mitocondrial e resultados preliminares do nosso laboratório demonstraram que a STC1 possui um efeito inibitório sobre a gliconeogênese renal e tanto a STC1 quanto a STC2 diminuem a incorporação de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ no fígado e no músculo gastrocnêmio, respectivamente, de ratos. No entanto, o papel desses hormônios no metabolismo de aminoácidos permanece desconhecido. No presente trabalho, as ações da STC1 e da STC2 foram avaliadas no fígado e no músculo gastrocnêmio excisados de ratos machos (*Rattus norvegicus*, n=48 animais) de 300±50g, alimentados *ad libitum*. Os resultados obtidos mostram que a STC1, no fígado, diminuiu a captação do ácido 2-(metilamino)isobutírico, aumentou a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase, diminuiu a atividade da enzima malato desidrogenase mitocondrial e estimulou a síntese de glicogênio a partir da alanina. A STC2, no fígado, diminuiu a atividade da enzima malato desidrogenase mitocondrial, estimulou a síntese de proteínas a partir de leucina, e estimulou a síntese de glicogênio a partir de alanina. Já, no músculo, a STC2 estimulou a oxidação de leucina e a incorporação desse aminoácido em proteínas. Esses resultados confirmam a existência de ações das STC1 e STC2 no metabolismo de aminoácidos e sugerem, com exceção da ação da STC2 sobre a enzima malato desidrogenase, um papel anabólico para a STC2 em ambos os tecidos. A mesma afirmação não pode ser feita para a STC1, que apresentou efeitos antagônicos no tecido hepático. Por fim, o trabalho mostrou que as ações da STC1 e da STC2 sobre as vias metabólicas dos aminoácidos ocorrem com a utilização de doses muito baixas desses hormônios.

Palavras-chave: STC, fígado, músculo gastrocnêmio, alanina, leucina, AIB, MeAIB

ABSTRACT

ROSSETTI, C. L. **Actions of the hormones Stanniocalcin-1 and Stanniocalcin-2 on the amino acid metabolism in rats.** 2013. 90 f. Dissertation (Master Degree) – Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

Stanniocalcins (STC) are glycoprotein hormones that were first discovered in teleostean fishes. In mammals, these hormones are expressed in a variety of tissues. Besides its role on the calcium and phosphate transport by the kidneys and intestine, they are involved in processes such as carcinogenesis, reproduction and growth. Recently it has been shown that STC1 and STC2 affect the control of intermediary metabolism. Binding sites for STC1 have been already identified in the mitochondrial membrane. Preliminary results of our laboratory showed that STC1 has an inhibitory effect on renal gluconeogenesis in rats and both STC1 and STC2 decrease the ^{14}C -glucose incorporation into $^{14}\text{CO}_2$ in the liver and the gastrocnemius muscle, respectively. Despite these evidences that STC1 and STC2 have a role in the control of glucose and lipids metabolism, the function of these hormones in amino acids metabolism remains unknown. In the present study, the STC1 and STC2 actions were evaluated in livers and gastrocnemius muscles excised from male rats (*Rattus norvegicus*, n=48 animals). The rats weighted $300\pm 50\text{g}$ and were fed *ad libitum*. The results show that STC1 decreased 2-(metilamine)isobutyric acid uptake, increased Na^+/K^+ -ATPase activity, decreased mitochondrial malate dehydrogenase activity and stimulated glycogen synthesis from alanine. All actions of STC1 were shown in the hepatic tissue and this hormone did not affect any parameter in muscular tissue. In the liver, STC2, decreased the mitochondrial malate dehydrogenase activity, stimulated protein synthesis from leucine and stimulated glycogen synthesis from alanine. In muscle, STC2 stimulated leucine incorporation into CO_2 and proteins. These results confirm the regulatory role of STC1 and STC2 on amino acid metabolism in muscle and liver of rats. They suggest, with exception to the STC2 action into the hepatic malate dehydrogenase, an anabolic role for STC2 in both tissues. However this cannot be stated for STC1, which show antagonistic effects in the hepatic tissue. Lastly, another important finding of this study is that STC1 and STC2 actions on amino acid metabolism occur with low hormone concentrations.

Keywords: STC, liver, gastrocnemius muscle, alanine, leucine, AIB, MeAIB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura e estereoisomerismo nos α -aminoácidos.....	18
Figura 2 -	Reações do ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo do ácido cítrico.....	22
Figura 3 -	Resumo do catabolismo dos aminoácidos.....	23
Figura 4 -	Ligações peptídicas formadoras das proteínas.....	24
Figura 5 -	Vias opostas da glicólise e da gliconeogênese em fígado de rato.....	26
Figura 6 -	Efeito comparativo da STC1 de peixe, da STC1 humana (hSTC-1) e da STC2 humana (hSTC-2) no transporte de cálcio através das brânquias (GCAT) em peixes.....	33
Figura 7 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na captação de ^{14}C -MeAIB no fígado de ratos.....	52
Figura 8 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na captação de ^{14}C -AIB no fígado de ratos.....	53
Figura 9 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na oxidação de L-[U- ^{14}C]Alanina a $^{14}\text{CO}_2$ no fígado de ratos.....	54
Figura 10 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na atividade enzimática da MDH no fígado de ratos.....	55
Figura 11 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na formação de ^{14}C -glicose a partir de L-[U- ^{14}C]Alanina no fígado de ratos.....	56
Figura 12 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na formação de glicogênio a partir de L-[U- ^{14}C]Alanina no fígado de ratos.....	57
Figura 13 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na formação de lipídios a partir de L-[U- ^{14}C]Alanina no fígado de ratos.....	58
Figura 14 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na síntese de ^{14}C -proteínas a partir de L-[U- ^{14}C]Alanina no fígado de ratos.....	59
Figura 15 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na síntese de ^{14}C -proteínas a partir de L-[U- ^{14}C]Leucina no fígado de ratos.....	60
Figura 16 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase no fígado de ratos.....	61

Figura 17 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na captação de ^{14}C -MeAIB no músculo gastrocnêmio de ratos.....	62
Figura 18 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na captação de ^{14}C -AIB no músculo gastrocnêmio de ratos.....	63
Figura 19 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na oxidação de L-[U- ^{14}C]Alanina a $^{14}\text{CO}_2$ no músculo gastrocnêmio de ratos.....	64
Figura 20 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na oxidação de L-[U- ^{14}C]Leucina a $^{14}\text{CO}_2$ no músculo gastrocnêmio de ratos.....	65
Figura 21 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na síntese de ^{14}C -Proteínas a partir de L-[U- ^{14}C]Alanina no músculo gastrocnêmio de ratos.....	66
Figura 22 -	Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na síntese de ^{14}C -Proteínas a partir de L-[U- ^{14}C]Leucina no músculo gastrocnêmio de ratos.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação dos dois homólogos da stanniocalcina de mamíferos.....	32
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ -colecalciferol	1,25-Dihidroxicolecalciferol
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ADP	Adenosina difosfato ou difosfato de adenosina
AIB	Ácido 2-aminoisobutírico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico ou monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Teste de análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato ou trifosfato de adenosina
BCH	Ácido 2-aminobiciclo(2,2,1)heptano-2-carboxílico
BSA	Albumina sérica bovina
CaSR	Receptores de membrana sensíveis à Ca ²⁺
CAT	Ciclo do ácido tricarboxílico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais em Laboratório
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicolamino tetracético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
GCAT	Transporte de cálcio através das brânquias (Gill calcium transport)
GTP	Guanosina trifosfato ou trifosfato de guanosina
HHM	Humoral hypercalcemia of malignancy

hSTC-1	Stanniocalcina1 humana
hSTC-2	Stanniocalcina2 humana
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
KHB	Tampão Krebs-Henseleit bicarbonato
LH	Hormônio luteinizante
LSD	Gotícula de armazenagem de lipídio (lipid storage droplet)
MDCK	Linhagem celular de rim canino Madin-Darby (Madin-Darby canine kidney)
MDH	Malato desidrogenase
MeAIB	Ácido 2-(metilamino)isobutírico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>pck1</i>	Isoforma citosólica da enzima Fosfoenolpiruvato carboxicinase
<i>pck2</i>	Isoforma mitocondrial da enzima Fosfoenolpiruvato carboxicinase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinase
PK	Piruvato cinase
PKA	Proteína cinase A
PMA	Phorbol 12-myristato 13-acetato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
POPOP	1,4-Bis benzeno
PPO	2,5-Diphenyloxazole
PTH	Paratohormônio ou hormônio da paratiteóide
PTHrP	Proteína relacionada ao hormônio da paratireoide
RNA	Ácido ribonucleico

STC1	Stanniocalcina 1
STC2	Stanniocalcina 2
TCA	Ácido tricloroacético
UDP	Uridina difosfato
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μCi	Microcurrie
μg	Microgramas
μL	Microlitro
Ca ²⁺	Íon cálcio
Cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
Dp	Desvio padrão
Dpm	Desintegrações por minuto
G	Gramas
GBq	Gigabecquerel
H ₂ O	Água
K ⁺	Íon Potássio
Kcal	Quilocaloria
kDa	Quilodalton
K _m	Constante de dissociação enzimática
KOH	Hidróxido de potássio
M	Molar
mCi	Milicurie
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar

Mmol	Milimol
Na ⁺	Íon sódio
Ng	Nanograma
NH ₄ ⁺	Íon amônio
nM	Nanomolar
Nm	Nanometros
O ₂	Gás oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico ou de hidrogênio
P _i	Fosfato inorgânico
Rpm	Rotações por minuto
U	Unidade
V _{máx}	Velocidade máxima
x g	Gravidades

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Metabolismo dos Aminoácidos.....	18
1.2	Stanniocalcina (STC).....	28
1.2.1	<u>Stanniocalcina em Peixes.....</u>	29
1.2.2	<u>Stanniocalcina em Mamíferos.....</u>	31
1.2.3	<u>Ações das Stanniocalcinas sobre o Metabolismo Intermediário em Mamíferos.....</u>	37
2	OBJETIVO GERAL.....	40
2.1	Objetivos Específicos.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	Animais.....	41
3.2	Procedimentos Experimentais.....	41
3.3	Captação de Aminoácidos.....	42
3.4	Oxidação de Aminoácidos.....	43
3.5	Atividade Enzimática da Enzima Malato Desidrogenase (MDH) (E.C.1.1.1.37).....	44
3.6	Formação de Glicose a partir de Alanina.....	45
3.7	Incorporação de Alanina em Glicogênio.....	46
3.8	Incorporação de Alanina em Lipídios.....	47
3.9	Incorporação de Aminoácidos em Proteínas.....	47
3.10	Atividade da Bomba Na⁺/K⁺-ATPase.....	48

3.11	Análise Bioquímica.....	50
3.12	Análise Estatística.....	50
3.13	Proteção ao Pesquisador.....	50
3.14	Tratamento de Resíduos.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Ações da STC1 e da STC2 sobre o fígado de <i>Rattus norvegicus</i>.....	52
4.1.1	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de ¹⁴C-MeAIB.....</u>	52
4.1.2	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de ¹⁴C-AIB.....</u>	53
4.1.3	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴CO₂.....</u>	53
4.1.4	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a atividade da enzima Malato Desidrogenase (MDH) mitocondrial</u>	54
4.1.5	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a formação de ¹⁴C-Glicose a partir de L-[U-¹⁴C]Alanina.....</u>	55
4.1.6	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação da L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴C-Glicogênio.....</u>	56
4.1.7	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴C-Lipídios totais.....</u>	57
4.1.8	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴C-Proteínas.....</u>	58
4.1.9	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Leucina em ¹⁴C-Proteínas.....</u>	59
4.1.10	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a atividade da Bomba Na⁺/K⁺-ATPase.....</u>	60

4.2	Ações da STC1 e da STC2 sobre o músculo gastrocnêmio de <i>Rattus norvegicus</i>.....	62
4.2.1	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de ¹⁴C-MeAIB.....</u>	62
4.2.2	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de ¹⁴C-AIB.....</u>	63
4.2.3	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴CO₂.....</u>	64
4.2.4	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Leucina em ¹⁴CO₂.....</u>	65
4.2.5	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴C-Proteínas.....</u>	66
4.2.6	<u>Estudo <i>in vitro</i> da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Leucina em ¹⁴C-Proteínas.....</u>	67
5	DISCUSSÃO.....	68
5.1	Ações da STC1 e da STC2 sobre o fígado de <i>Rattus norvegicus</i>	68
5.2	Ações da STC1 e da STC2 sobre o músculo gastrocnêmio de <i>Rattus norvegicus</i>	75
6	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabolismo dos Aminoácidos

Todas as células dos organismos, desde os unicelulares até os complexos organismos multicelulares como os mamíferos, requerem aminoácidos para construir e reconstruir suas estruturas, sintetizar proteínas essenciais, servir como precursores para compostos contendo nitrogênio, e suprir fontes de energia metabólica. Os aminoácidos são moléculas cuja estrutura está composta por um grupo amino, um grupo ácido carboxílico, um átomo de hidrogênio e um grupo químico de diferentes tamanhos, formas e propriedades químicas, chamado cadeia lateral (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992). Estes grupos estão ligados ao mesmo átomo de carbono, o carbono α . Em decorrência do arranjo tetraédrico dos orbitais ligantes ao redor do átomo de carbono α , os quatro grupos diferentes podem ocupar dois arranjos espaciais únicos e, portanto, os aminoácidos possuem dois possíveis estereoisômeros, L ou D (NELSON & COX, 2011) (Fig. 1).

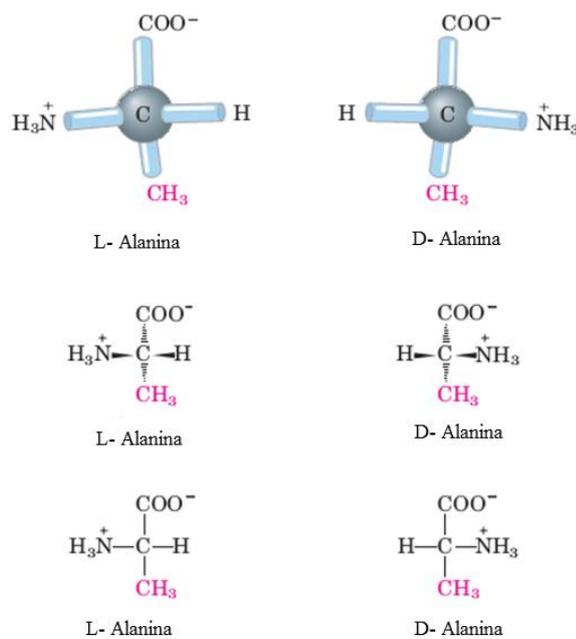


Figura 1 - Estrutura e estereoisomerismo nos α -aminoácidos.

FONTE: NELSON & COX (2011, pag.72)

Vinte aminoácidos diferentes são utilizados para construir proteínas em todas as espécies, de bactérias aos humanos. Além desses 20 aminoácidos, existem outros menos comuns: alguns são resíduos modificados depois de uma proteína ter sido sintetizada; outros são aminoácidos presentes nos organismos vivos, mas não constituintes das proteínas (NELSON & COX, 2011). Dos vinte aminoácidos presentes nas proteínas, onze são sintetizados pelo organismo, sendo que destes, dez são produzidos a partir de glicose, e a tirosina é sintetizada a partir do aminoácido essencial fenilalanina (SMITH et al., 2007). Os outros nove aminoácidos (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina) são considerados essenciais e devem ser obtidos da dieta.

Os vinte aminoácidos estão agrupados em diferentes classificações de acordo com as características de polaridade e estruturais das cadeias laterais. Esses agrupamentos são úteis para descrever funções ou vias metabólicas dos aminoácidos. A glicina é o aminoácido mais simples e não se encaixa bem em nenhuma classificação devido ao fato de sua cadeia lateral ser apenas um átomo de hidrogênio. A alanina, a prolina e os aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina, são aminoácidos alifáticos, apolares. Os aminoácidos aromáticos são caracterizados pela fenilalanina, tirosina e triptofano, pois todos contêm estruturas em anel com propriedades similares. Os aminoácidos com cadeias laterais que contêm um grupo amida (asparagina e glutamina) ou um grupo hidroxila (serina e treonina) podem ser classificados como aminoácidos alifáticos, polares, sem carga. A cisteína e a metionina contêm enxofre. Por fim, os aminoácidos ácidos e básicos incluem o aspartato, o glutamato, a histidina, a lisina e a arginina (SMITH et al., 2007).

O processo digestivo quebra as proteínas em seus aminoácidos constituintes, e, então, esses aminoácidos são absorvidos pelas células epiteliais intestinais e carregados para o fígado via veia porta hepática. A concentração de aminoácidos dentro das células é, portanto, gerada tanto pelos aminoácidos captados do meio extracelular quanto pela síntese intracelular de aminoácidos e degradação das proteínas existentes dentro da célula.

Para que os aminoácidos possam exercer suas mais diversas funções nos órgãos-alvo, inclusive no tecido hepático, eles precisam, primeiramente, ser captados para o ambiente intracelular. Um dos mais significativos passos no metabolismo de aminoácidos reside na diferença de concentração entre os aminoácidos do plasma e dos tecidos. Essa diferença é possível devido ao transporte dos aminoácidos através das membranas biológicas, um processo que é altamente controlado e sujeito à regulação, endócrina ou não-endócrina, para manter uma concentração adequada de aminoácidos intracelulares (CHRISTENSEN & CULLEN, 1968). Vários sistemas de transporte, mais ou menos específicos, evoluíram para que a transferência dos aminoácidos possa ocorrer tanto entre compartimentos subcelulares distintos quanto entre o meio intracelular e o extracelular. Esses processos de transporte são classificados de acordo com seus aspectos estruturais e energéticos, assim que: aminoácidos neutros são transportados por três sistemas principais, o sistema A, o ASC e o L;

dois sistemas, o X_{AG}^- e X_C^- , servem para o transporte de aminoácidos aniônicos, e o sistema y^+ medeia o transporte de aminoácidos catiônicos (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992).

O sistema A é um sistema de transporte regulável que transfere aminoácidos com cadeia laterais não-ramificadas de vários tamanhos, como é o caso da L-alanina, L-serina, L-metionina e glicina, para dentro das células. O mecanismo de transporte proposto para esse sistema é de simporte eletrogênico com sódio (transporte ativo secundário) com a estequiometria aminoácido/sódio de 1:1. A energia necessária para o transporte é fornecida pelo gradiente eletroquímico do sódio gerado pela bomba Na^+/K^+ -ATPase (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992). Esse sistema de transporte pode ser estudado através da captação do ácido 2-(metilamino)isobutírico (MeAIB). O MeAIB é um análogo específico não-metabolizável para esse modelo de transporte, ou seja, ele é transportado pelo mesmo mecanismo que os aminoácidos dependentes do sistema A, porém não é metabolizado pela célula.

Já o sistema ASC é um sistema constitutivo que aceita aminoácidos de cadeia lateral linear de vários tamanhos, como a L-alanina, a L-glutamina, a L-serina e a L-cisteína. Esse sistema possui uma estereoseletividade rigorosa. Ele é sódio-dependente, mas não é eletrogênico, sendo que o mecanismo proposto para esse transporte é um antiporte dos aminoácidos obrigatoriamente associado com um movimento do sódio em ambas as direções (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992). O funcionamento da totalidade dos sistemas sódio-dependentes, isto é, do sistema A e do sistema ASC juntos, pode ser estudado utilizando o análogo artificial não metabolizável ácido 2-aminoisobutírico (AIB) (MACKENZIE et al., 1992).

Por fim, o sistema L é o sistema responsável pelo transporte dos aminoácidos neutros que possuem cadeia lateral linear ou ramificada, como são a L-leucina, a L-isoleucina e a L-valina. A operação desse sistema é independente do sódio e do potencial elétrico da membrana, sendo estimulado por substratos presentes no compartimento-trans. O mecanismo proposto para o sistema L é um antiporte acoplado ao substrato (transporte ativo terciário), cuja energia é provida pelo gradiente químico transmembrana dos substratos L-reativos. O transporte de aminoácidos para o interior da célula através do sistema L aproveita a entrada de aminoácidos como a L-metionina e a L-cisteína que são concentrados intracelularmente através do sistema A e ASC, respectivamente. O acúmulo intracelular desses aminoácidos estimula a atividade do sistema L que, por troca, promove o movimento de entrada dos aminoácidos ramificados. O análogo para avaliar esse sistema de transporte é ácido 2-aminobiciclo(2,2,1)heptano-2-carboxílico (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992).

Após os aminoácidos terem sido transportados para o meio intracelular do hepatócito, eles precisam ter o grupamento amino de sua estrutura retirado, pois só assim os átomos de carbono estarão disponíveis para serem utilizados como fonte energética. Esse processo é realizado principalmente pela transaminação, que consiste na transferência do nitrogênio do aminoácido original para o α -

cetoglutarato, formando glutamato, enquanto o aminoácido original é convertido em seu α -cetoácido correspondente. As enzimas que catalisam essas reações são conhecidas como transaminases ou aminotransferases. Como essa reação é reversível, ela pode ser utilizada para remover o nitrogênio de aminoácidos ou para transferir nitrogênio para α -cetoácidos para formar aminoácidos. Dessa forma, elas estão envolvidas tanto na degradação quanto na síntese de aminoácidos.

Os átomos de nitrogênio resultantes da molécula do aminoácido são liberados na forma de amônia ou íon amônio (NH_4^+). No entanto, a amônia é tóxica, particularmente ao cérebro e ao sistema nervoso central. Por isso, nos animais terrestres, ela é rapidamente removida do sangue e convertida, através do ciclo da ureia que ocorre no fígado, em ureia. A ureia é então excretada na urina. A urina dos mamíferos também contém pequenas quantidades de outros produtos nitrogenados de excreção (ácido úrico, creatinina e NH_4^+) derivados da degradação de aminoácidos e compostos sintetizados a partir de aminoácidos. Alguma quantidade de nitrogênio também é perdida no suor, nas fezes e nas células que descamam (SMITH et al., 2007).

Após a transaminação, os aminoácidos podem ser: a) oxidados como substratos para liberar energia, processo que pode ocorrer diretamente a partir dos aminoácidos ou pela conversão dos mesmos em glicose ou corpos cetônicos; b) utilizados para sintetizar proteínas, tanto séricas como as estruturais dos órgãos; ou c) precursores para síntese de compostos essenciais contendo nitrogênio, como os aminoácidos não-essenciais, os hormônios, os neurotransmissores, o DNA e o RNA ou o grupo heme da hemoglobina (SMITH et al., 2007).

Nos animais, os aminoácidos sofrem oxidação em três circunstâncias metabólicas diferentes: a) durante a síntese e a degradação normais de proteínas celulares, alguns aminoácidos liberados pela hidrólise de proteínas não são necessários para a biossíntese de novas proteínas, sofrendo, então, degradação oxidativa; b) quando uma dieta é rica em proteínas, e os aminoácidos ingeridos excedem as necessidades do organismo para a síntese proteica, o excesso é catabolizado; ou c) durante o jejum ou o diabetes mellitus não controlado, quando os carboidratos não estão disponíveis ou não são adequadamente utilizados, os aminoácidos resultantes da proteólise são utilizados como combustível (NELSON & COX, 2011). O fígado é o principal local de oxidação de aminoácidos, porém os aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) são oxidados principalmente no músculo esquelético e em outros tecidos, e não no fígado (SMITH et al., 2007). Nesses tecidos, a respiração celular acontece em três estágios principais: no primeiro, os aminoácidos são oxidados para produzirem fragmentos de dois carbonos, na forma do grupo acetil da acetil-coenzima A (acetil-CoA); no segundo, os grupos acetil entram no ciclo do ácido tricarboxílico (CAT), uma série de reações que os oxidam enzimaticamente a CO_2 ; e, no terceiro, as coenzimas geradas pelo CAT são oxidadas, doando elétrons que são transferidos ao O_2 , processo que libera energia na forma de ATP (NELSON & COX, 2011).

A oxidação de substratos ocorre na mitocôndria celular. Para alguns aminoácidos, essa via começa com a conversão dos mesmos a acetil-CoA. A partir daí, o grupo acetil do acetil-CoA se condensa com o oxaloacetato para formar o composto citrato. O citrato é, em seguida, transformado em isocitrato, que é desidrogenado com a perda de CO_2 para produzir o α -cetogluturato. O α -cetogluturato perde uma segunda molécula de CO_2 originando o composto succinato que é então convertido, por quatro etapas enzimáticas, no composto oxaloacetato. O oxaloacetato formado está pronto para reagir com outra molécula de acetil-CoA, reiniciando o ciclo (Fig. 2). Durante uma volta do ciclo do ácido tricarboxílico, os diferentes precursores são oxidados por quatro desidrogenases: a isocitrato-desidrogenase, a α -cetogluturato desidrogenase, a succinato desidrogenase e, por último, a malato desidrogenase. Essas enzimas são responsáveis pela transferência de elétrons para o NAD^+ ou o FAD, gerando NADH ou FADH_2 , enquanto liberam CO_2 (NELSON & COX, 2011).

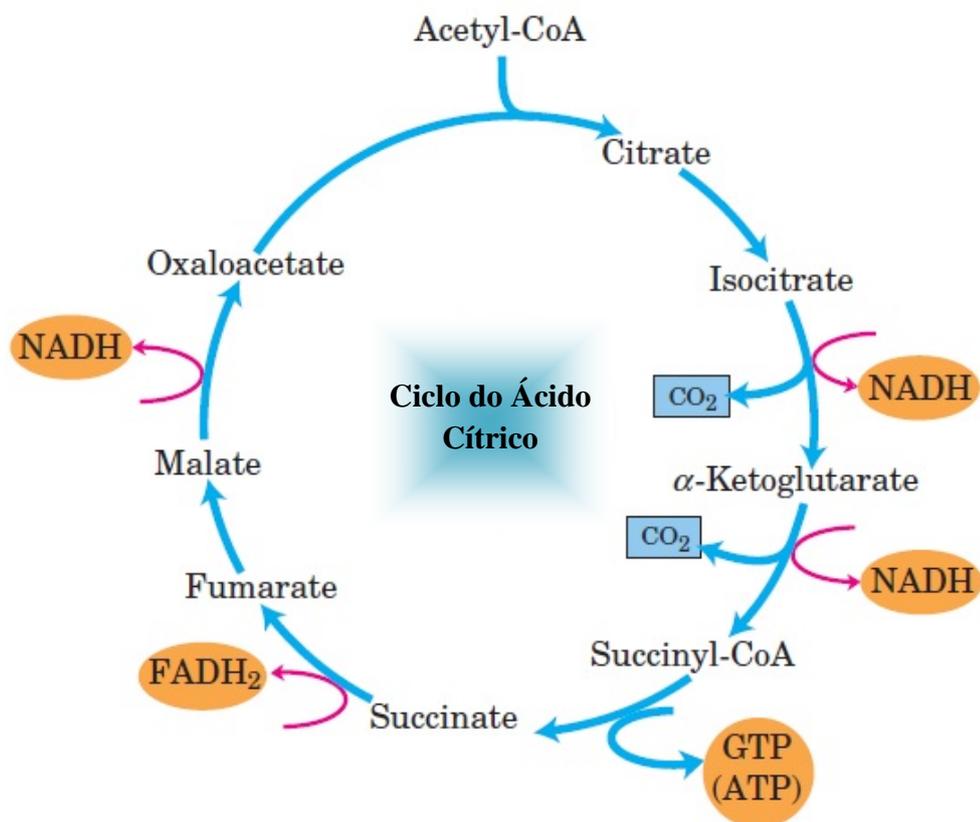


Figura 2 - Reações do ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo do ácido cítrico.

FONTE: NELSON & COX (2011, p.615)

No entanto, apenas parte ou a totalidade dos esqueletos carbônicos de sete, dos vinte aminoácidos, são, em última instância, quebrados para liberar diretamente acetil-CoA. As rotas para a oxidação de muitos aminoácidos convertem seus esqueletos de carbonos em intermediários do CAT que podem regenerar oxaloacetato. Cinco aminoácidos são convertidos em α -cetogluturato, quatro em succinil-CoA, dois em fumarato e dois em oxaloacetato. Além disso, seis aminoácidos têm seu esqueleto carbonado convertido em piruvato, que pode ser convertido em acetil-CoA ou em oxaloacetato (Fig. 3).

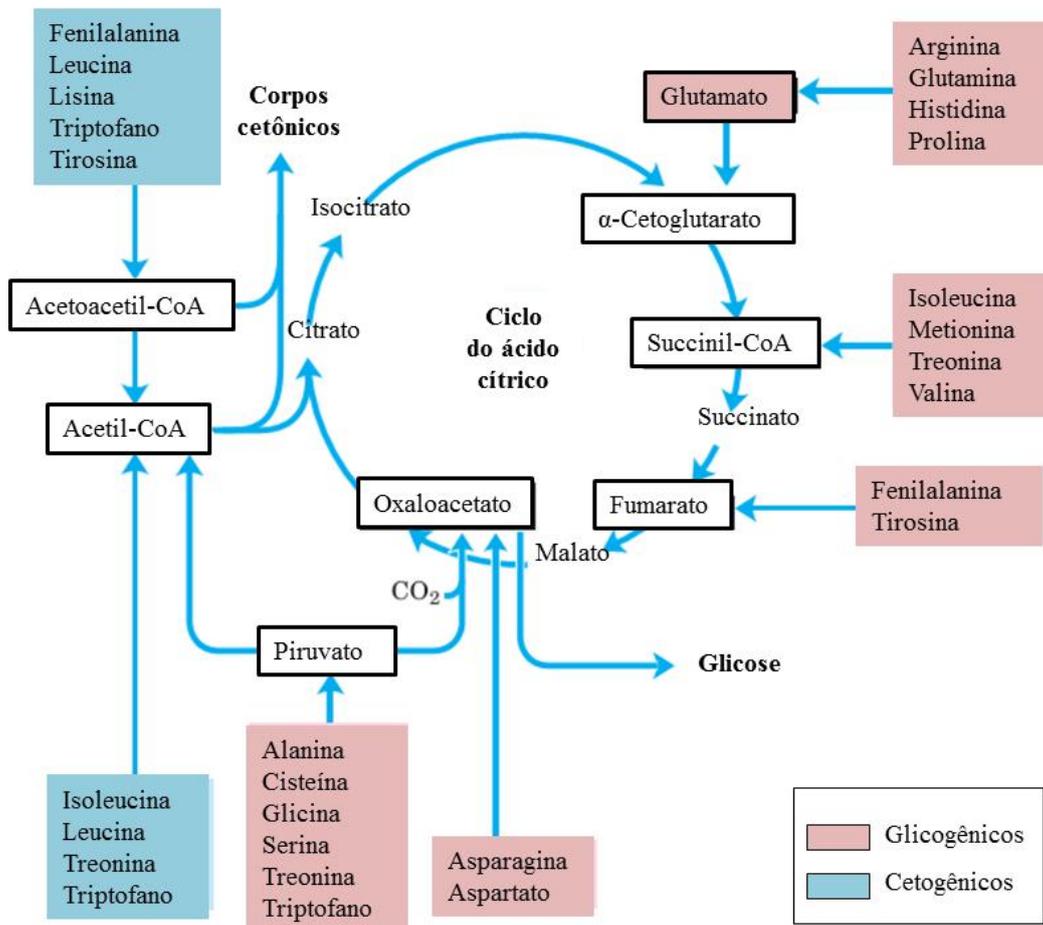


Figura 3 - Resumo do catabolismo dos aminoácidos. Os aminoácidos estão agrupados de acordo com seu principal produto final de degradação. Alguns aminoácidos estão listados mais de uma vez, pois diferentes partes de seus esqueletos carbonados são degradados em diferentes produtos finais.

FONTE: NELSON & COX (2011, p.688)

Na última etapa da oxidação dos aminoácidos, os elétrons perdidos dos substratos energéticos durante as reações oxidativas são transferidos para o O_2 por uma série de proteínas na cadeia de transporte de elétrons. Nessa cadeia de transporte, catalisada pela succinato-tioquinase (succinil-CoA-

sintetase), os NADHs e o FADH₂ gerados pelo ciclo CAT são reoxidados, produzindo aproximadamente 2,5 ATPs para cada NADH e 1,5 ATP para o FADH₂. Conseqüentemente, a energia total liberada pelo ciclo CAT e pela fosforilação oxidativa é de cerca de 10 ligações fosfato ricas em energia (ATPs) para cada grupo acetil oxidado, cuja função é fornecer energia para a maioria dos processos que ocorrem na célula, incluindo reações de biossíntese e transporte ativo através de membranas. À medida que esses processos utilizam energia, o ATP é convertido novamente em difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico (P_i). A completa oxidação de proteínas a CO₂, H₂O e NH₄⁺ no corpo libera cerca de 4kcal/g (SMITH et al., 2007).

No entanto, quando não são prontamente oxidados, os aminoácidos podem ser estocados. Os organismos possuem diferentes substratos energéticos, os quais são leves em peso, ricos em energia e prontamente convertidos em substâncias oxidáveis. Embora não seja a principal reserva energética do corpo, papel ocupado pelas gorduras e pelo glicogênio em segundo lugar, a proteína corporal, particularmente a das grandes massas musculares, também serve como reserva de substratos energéticos. A maior parte da massa total de aminoácidos celular é encontrada combinada quimicamente formando proteínas (MACKENZIE et al., 1992). Diferentes aminoácidos são utilizados pelos organismos como precursores para a síntese de proteínas. Em proteínas, os aminoácidos são sempre L- α -aminoácidos, ou seja, o grupo amino está ligado ao carbono α na configuração L (SMITH et al., 2007). A sequência de aminoácidos da proteína, chamada de estrutura primária, é determinada pelo código genético para cada proteína. Esses aminoácidos são unidos através de ligações covalentes entre o grupo ácido carboxílico de um aminoácido e o grupo amino do aminoácido seguinte, chamadas de ligações peptídicas, formando, assim, cadeias lineares (Fig. 4). As proteínas são cadeias polipeptídicas de 100 a muitos milhares de resíduos de aminoácidos (NELSON & COX, 2011) e as propriedades químicas dos aminoácidos conferem a cada proteína suas características próprias.

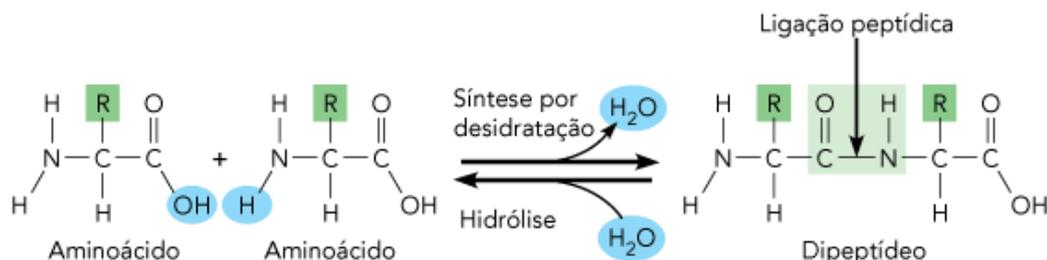


Figura 4 - Ligações peptídicas formadoras das proteínas. O grupo α -amino de um aminoácido atua como um nucleófilo para deslocar o grupo hidroxil de outro aminoácido, formando uma ligação peptídica.

FONTE: MARIEB & HOEHN (2009, p.47)

Todas as proteínas dentro da célula têm uma meia-vida, que é o tempo no qual 50% das proteínas que foram sintetizadas, em um tempo específico, deverão ser degradadas. Sendo assim, as proteínas do corpo estão sob constante renovação, ou seja, elas estão constantemente sendo degradadas a aminoácidos e resintetizadas. O *turnover* proteico permite mudanças na concentração de diferentes proteínas produzidas nos tecidos em resposta às mudanças fisiológicas, e remove continuamente as proteínas danificadas ou modificadas. Ele também fornece aminoácidos específicos que podem ser utilizados como substratos oxidáveis, precursores para as diferentes vias metabólicas e para a síntese de heme, de creatina-fosfato, de purinas e pirimidinas. Além disso, ajuda a manter o pH sanguíneo. A concentração de aminoácidos livres existente no sangue é obtida pela degradação de proteínas e consequente liberação de aminoácidos e pelos aminoácidos oriundos da dieta. Além disso, a concentração de aminoácidos livres sofre contribuição da redução da oxidação e da velocidade de síntese dos aminoácidos.

Ainda que os aminoácidos possam ser diretamente oxidados, gerando energia para as células do corpo, existem alguns tecidos, como o cérebro, as células sanguíneas vermelhas, os testículos, entre outros, que dependem exclusivamente de glicose como fonte de energia metabólica (NELSON & COX, 2011). Portanto, para manter o perfeito funcionamento desses órgãos em situações de jejum ou exercício vigoroso, onde a oferta de glicose é escassa, os mamíferos possuem mecanismos que visam à manutenção dos níveis sanguíneos de glicose. A gliconeogênese, que ocorre primariamente no fígado, é um desses mecanismos. Ela consiste na rota de síntese de glicose a partir de outros compostos que não pertencem à classe dos carboidratos, como são o lactato, o glicerol e alguns aminoácidos glicogênicos (DOI et al., 2007).

A gliconeogênese inicia com a transformação dos aminoácidos em piruvato. Esse substrato pode, então, ser convertido em oxaloacetato através de reação, que requer uma molécula de ATP, catalisada pela enzima piruvato carboxilase. O oxaloacetato formado, por sua vez, pode ser transformado em fosfoenolpiruvato (PEP) pela ação da enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK). A partir daí o fosfoenolpiruvato sofre uma série de reações que, na sua grande maioria, são inversas àquelas que ocorrem durante a glicólise, dando origem, como produto final, à glicose. As rotas da glicólise e da gliconeogênese diferem apenas em três pontos: a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato (PEP) pela enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK), e as reações que removem fosfato da frutose-1,6-bisfosfato para formar frutose-6-fosfato, catalisada pela frutose-bisfosfatase, e da glicose-6-fosfato para formar glicose, responsabilidade da enzima glicose-6-fosfatase (Fig. 5). Durante as reações gliconeogênicas, 6 moles de ligações de fosfato ricas em energia são quebrados e consumidos. Dois moles de piruvato são necessários para a síntese de 1 mol de glicose (SMITH et al., 2007).

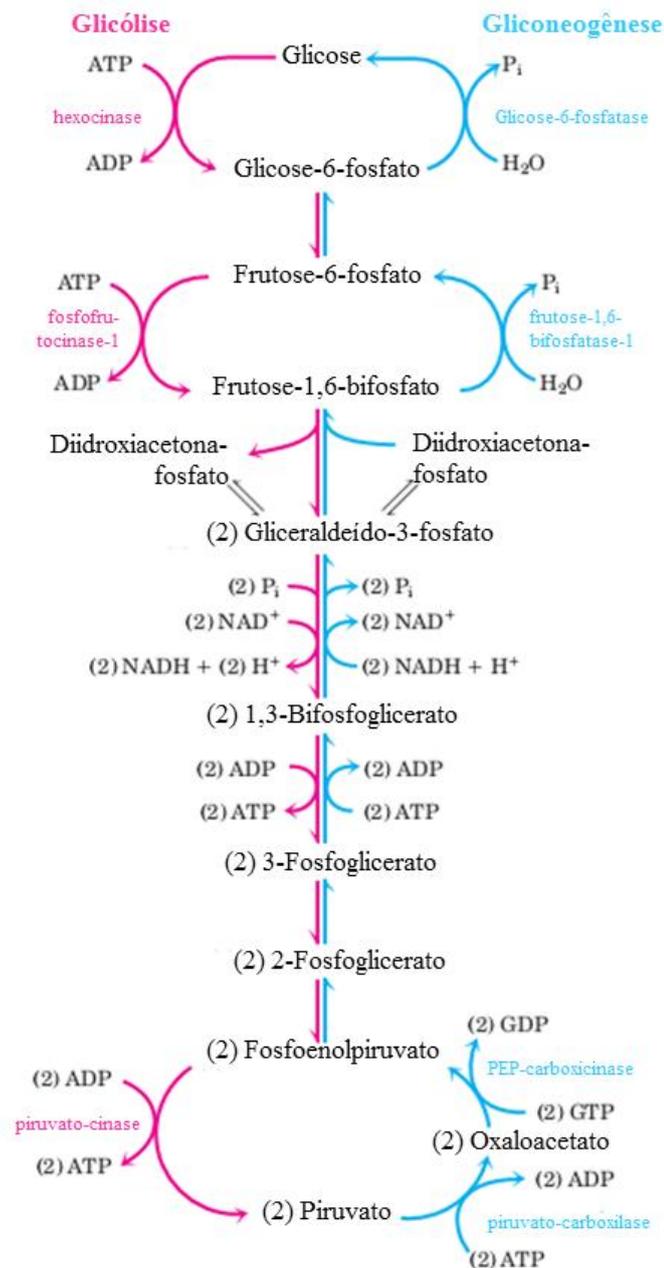


Figura 5 - Vias opostas da glicólise e da gliconeogênese em fígado de rato. As reações da glicólise estão do lado esquerdo, em rosa; a via oposta, a gliconeogênese, está mostrada do lado direito, em azul.

FONTE: NELSON & COX (2011, p.553)

Os aminoácidos utilizados para a gliconeogênese são originados, principalmente, do músculo, onde podem ser obtidos pela degradação de proteínas musculares. Embora a alanina seja o principal aminoácido glicogênico em vertebrados, outros aminoácidos, como a serina, servem como fontes de carbono para a síntese de glicose, pois também formam piruvato, o substrato para a etapa inicial do processo. Além disso, alguns aminoácidos formam intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico

(CAT), como o citrato, o α -cetoglutarato, o succinato e o malato, os quais podem sofrer oxidação a oxaloacetato e então entrar na rota gliconeogênica.

Quando a glicose, tanto obtida pela dieta quanto aquela obtida através da gliconeogênese, que é a que nos interessa neste trabalho, não é prontamente utilizada pelos tecidos, ela pode ser convertida em formas poliméricas de armazenamento. O glicogênio é a forma de armazenamento da glicose encontrada na maioria dos tipos celulares. É bem documentado que o glicogênio hepático pode ser formado por uma via direta a partir de glicose ou por uma via indireta a partir de precursores gliconeogênicos. A via indireta aparentemente continua a operar mesmo durante uma infusão de glicose ou após uma ingestão de carboidratos, quando há uma quantidade de glicose disponível adequada para prover glicogênio pela via direta (MOORE et al., 1991).

Na via de síntese de glicogênio, processo chamado de glicogênese, a glicose é fosforilada, pela enzima hexocinase, à glicose-6-fosfato que é convertida em glicose-1-fosfato pela ação da enzima fosfoglicomutase. A glicose-1-fosfato é convertida em uridina difosfato (UDP)-glicose que sofre a ação da enzima glicogênio-sintase para a biossíntese de glicogênio (SMITH et al. 2007). A glicogênio-sintase não pode formar as ligações encontradas nos pontos de ramificação do glicogênio, que, por sua vez, são formadas pela enzima de ramificação, chamada de glicosil-(4 \rightarrow 6)-transferase (NELSON & COX, 2011). O fígado e o músculo esquelético contêm as maiores reservas de glicogênio; no entanto, os propósitos do glicogênio no fígado são muito diferentes daqueles do músculo esquelético e de outros tecidos. O glicogênio hepático é a primeira e imediata fonte de glicose para a manutenção de níveis sanguíneos adequados de glicose quando esta diminui sua participação na dieta, ou quando o exercício aumenta a utilização de glicose sanguínea pelos músculos.

Além de ser armazenada na forma de glicogênio, a glicose proveniente da gliconeogênese também pode ser armazenada na forma de lipídios. Para que essa via aconteça, a glicose excedente deve, primeiramente, ser convertida em ácidos graxos, e, então, estes darão origem aos lipídios. Além dessa via de formação de lipídios a partir de glicose, um excesso de proteínas na dieta também pode resultar em um aumento na síntese de lipídios. Nesse caso, a fonte de carbonos são aqueles aminoácidos que podem ser convertidos em acetil-CoA ou em intermediários do ciclo CAT (SMITH et al. 2007).

A formação de lipídios inicia com a conversão, no fígado, da glicose em piruvato por meio da glicólise. O piruvato, então, entra na mitocôndria e é transformado em acetil-CoA pela ação da piruvato-desidrogenase e em oxaloacetato pela ação da piruvato-carboxilase. Esses dois compostos não têm a capacidade de atravessar a membrana mitocondrial, portanto eles se condensam formando o citrato, que tem habilidade de sair da mitocôndria, e, no citosol, ele dá novamente origem a acetil-CoA e oxaloacetato. O acetil-CoA citosólico, através da enzima acetil-CoA-carboxilase, origina malonil-

CoA. Cada molécula de malonil-CoA doa dois carbonos que são adicionados, sequencialmente, à cadeia de ácido graxo em formação por ação da enzima ácido-graxo sintase. Essa sequência de reações é repetida até que a cadeia tenha 16 carbonos de comprimento, quando a molécula sofre uma hidrólise e é liberada como palmitato. O palmitato pode ser alongado e dessaturado para produzir uma série de ácidos graxos (SMITH et al., 2007). Os ácidos graxos têm dois destinos celulares principais: o primeiro é sua conversão em triacilgliceróis para o armazenamento de energia metabólica; e o segundo é ser incorporado aos componentes fosfolipídios de membrana (NELSON & COX, 2011).

1.2. Stanniocalcina (STC)

O cálcio é o íon mineral mais abundante no ser humano e o quinto elemento mais encontrado no organismo. Este íon participa de modo importante em múltiplos processos celulares e extracelulares, incluindo a proteólise de componentes do plasma, a sinalização celular, a manutenção do potencial de membrana celular, a contração muscular e a exocitose, além de, juntamente com o fosfato, ser um elemento fundamental na composição dos cristais de hidroxiapatita que dão resistência ao tecido ósseo (AIRES, 2012). Devido a sua importância nos vertebrados, a concentração de cálcio circulante deve ser mantida dentro de limites fisiológicos específicos. Por isso, um intrincado sistema, composto por sensores e hormônios, foi desenvolvido para a manutenção da homeostasia do cálcio nesse grupo animal. Esse sistema pode ser considerado um exemplo de complexidade evolutiva e é associado ao surgimento dos metazoários.

Em vertebrados terrestres, os níveis de cálcio plasmático são regulados, primariamente, por dois sistemas hormonais: um deles envolve a ação do hormônio calcitonina, cuja ação é hipocalcemiante; e o outro é comandado pelo paratohormônio (PTH), pelo 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂coleciferol) e pela proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP), que possuem ação hipercalcemiante (GUERREIRO et al., 2007). Esses hormônios atuam nos ossos influenciando as atividades dos osteoclastos e dos osteoblastos. Sabe-se que a hipercalcemia estimula a síntese e secreção de calcitonina que, por sua vez, inibe a ressorção óssea efetuada pelos osteoclastos, o que diminui a concentração de Ca²⁺ circulante (COSTANZO, 2007). Já o PTH e a PTHrP estimulam a atividade osteoclástica no osso, promovendo a transferência de cálcio para o plasma sanguíneo, e estimulam a reabsorção de cálcio nos rins e a absorção no

intestino via $1,25(\text{OH})_2$ -coleciferol, aumentando a concentração plasmática de cálcio (AIRES, 2012).

A PTHrP é uma proteína multifuncional produzida em vários tecidos que atua de forma autócrina, parácrina e endócrina, exercendo efeito anabólico sobre o osso. Ela foi descoberta em associação com certos tipos de câncer que causam elevações nos níveis de Ca^{2+} plasmático, cuja síndrome é denominada *humoral hypercalcemia of malignancy* (HHM). A PTHrP foi isolada pela primeira vez em 1988, e camundongos PTHrP-*knockouts* apresentam fenótipo letal com anomalias ósseas (MIAO et al., 2002). No entanto, novas funções e possíveis mecanismos de atuação dessa molécula têm sido sugeridos desde a recente descoberta de outros membros dessa família de proteínas. Um exemplo é a recente descoberta das stanniocalcinas, também conhecidas como hipocalcinas ou teleocalcinas, que são indispensáveis à vida dos peixes (AMEMIYA et al., 2002).

1.2.1. Stanniocalcinas em Peixes

Stanniocalcinas são hormônios glicoproteicos descobertos em peixes teleósteos (WAGNER et al., 1986). Nesses animais, as stanniocalcinas são secretadas por um par de pequenas glândulas endócrinas, de coloração creme, chamadas Corpúsculos de Stannius, que geralmente estão localizadas na superfície ventral dos rins. Os Corpúsculos de Stannius foram descobertos em 1839 pelo anatomista alemão Hermann Friedrich Stannius que acreditou, erroneamente, que se tratavam das glândulas adrenais dos peixes. Essa ideia foi defendida até o século XX quando Chester-Jones e colaboradores (1965) e Ogawa (1967) demonstraram, através de estudos de microscopia eletrônica, que as células dos Corpúsculos de Stannius possuíam as características citoplasmáticas de células secretoras de hormônios polipeptídicos, no entanto, não apresentavam qualquer atividade estereoidogênica. Baseado nessas características, os Corpúsculos foram confirmados como glândulas exclusivas de peixes.

Estudos subsequentes mostraram que a remoção dos Corpúsculos de Stannius causava hipercalcemia nos peixes (FONTAINE, 1964¹ apud YEUNG et al., 2012); no entanto se esses peixes eram mantidos em água com baixas concentrações de cálcio, eles não apresentavam esse aumento nos níveis de Ca^{2+} plasmáticos. Posteriormente, Fenwick e So (1974) mostraram que a atividade de transporte de cálcio nas brânquias de enguias que tiveram os Corpúsculos de Stannius excisados era dez vezes maior do que aquela apresentada por peixes que possuíam os Corpúsculos. Esses autores também mostraram que essa atividade de transporte era diminuída para os níveis normais quando as

¹ FONTAINE, M. Stannius' corpuscles and ionic (Ca, K, Na) of the interior environment of the eel (*Anguilla anguilla* L.). **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, 259: 875–878, 1964.

enguias stanniectomizadas recebiam uma injeção com extrato de Corpúsculo de Stannius (SO & FENWICK, 1979). Essas descobertas sugeriram que os Corpúsculos de Stannius possuíam um fator anti-hipercalcêmico que controlava os níveis de cálcio plasmáticos por inibir o transporte de cálcio nas brânquias.

Esse princípio ativo secretado pelos Corpúsculos de Stannius, a stanniocalcina 1 (STC1), foi purificado e parcialmente sequenciado de glândulas de salmão em 1986, e provou ser uma proteína glicosilada com potente efeito inibidor do transporte de cálcio pelas brânquias (WAGNER et al., 1986). A clonagem desse hormônio em diversas outras espécies de peixes mostrou que a sequência de aminoácidos da STC1 é única quando comparada a outros hormônios conhecidos de mamíferos e que essa proteína possui somente um parálogo conhecido, a STC2, que é o produto de um segundo gene relacionado (CHANG & REDDEL, 1998; DIMATTIA et al., 1998). O monômero ativo da STC1 de peixes possui aproximadamente 223 resíduos de aminoácidos, 25kDa, e a estrutura desse hormônio forma um dímero de cadeias polipeptídicas iguais (WAGNER, 1994) que possui onze cisteínas, das quais dez formam ligações dissulfeto intracadeia (HULOVA & KAWAUCHI, 1999), e acredita-se que 11^a cisteína é responsável pela formação do homodímero de 50kDa. Já o monômero da STC2 de peixes possui 34kDa, 14 cisteínas formando ligações dissulfeto e 37% de identidade com a sequência de aminoácidos da STC1 de peixe (LUO et al., 1995).

Em peixes, a elevação da concentração de cálcio extracelular e/ou dos níveis de cálcio na água é o principal estímulo para a degranulação das células do Corpúsculo de Stannius e a consequente liberação de STC1. A grande sensibilidade do Corpúsculo de Stannius ao cálcio é mediada por receptores sensíveis à Ca^{2+} (CaSR) existentes na membrana celular dessas glândulas (RADMAN et al., 2002). Esse mecanismo garante que o aumento dos níveis de cálcio extracelular estimule a liberação de STC1, e ocorra diminuição na captação de cálcio via brânquias. Além dos efeitos nas brânquias, a STC1 também inibe a absorção de cálcio pelo intestino (SUNDELL et al., 1992), e promove a reabsorção de fosfato, o principal quelante de cálcio endógeno, pelos rins (LU et al., 1994). Portanto, a principal função da STC1 é a prevenção de uma hipercalcemia tóxica.

O mecanismo pelo qual a STC1 atua nesses diferentes órgãos-alvo ainda não é conhecido. Em estudos com brânquias, Flik & Verboost (1993) acharam que Ca^{2+} -ATPases de baixa e alta afinidade são reguladas por STC1, e sugeriram, como alternativa, que a STC1 poderia atuar fechando canais de Ca^{2+} na membrana apical das células de cloreto. As células de cloreto são células específicas de brânquias de peixes teleósteos que são ricas em mitocôndrias e responsáveis, principalmente, pela captação de Cl^- . O fechamento dos canais de Ca^{2+} dessas células reduziria, assim, a permeabilidade das brânquias ao cálcio. Outro trabalho sugere como medida para redução do influxo de cálcio através das brânquias, a possibilidade de a STC1 remover, de alguma maneira desconhecida, esse cátion das células de cloreto. Isso envolveria um transportador ainda não caracterizado que exporta Ca^{2+} para a

água. Alternativamente, a STC1 também poderia promover a quelação de Ca^{2+} dentro do citosol, talvez com fosfato, ou poderia estimular a captação ativa de Ca^{2+} por organelas intracelulares, como as mitocôndrias que são bastante abundantes nas células de cloreto (WAGNER & DIMATTIA, 2006). A identificação de células-alvo da STC1 é prejudicada pela falta de informação sobre o receptor desse hormônio. Acredita-se que o sistema de sinalização do receptor seja acoplado a uma proteína G, pois uma cascata de ativação envolvendo AMPc e a PKA já foi demonstrada em células do túbulo proximal de linguados tratados com STC1 (LU et al., 1994); no entanto, a estrutura e as características do receptor ainda não foram identificadas.

O efeito hipocalcemiante apresentado pela STC1 é semelhante àquele apresentado pelo hormônio calcitonina e, ainda que em peixes ambos os hormônios estejam presentes, a capacidade de a STC1 evitar a hipercalemia ultrapassa a da calcitonina. O desenvolvimento de dois fatores hipocalcemiante nos peixes é essencial para regular a captação de cálcio da água. A concentração intracelular de Ca^{2+} nesses animais gira em torno de 100nM, enquanto que os níveis de Ca^{2+} na água que os envolve variam de 0,1mM na água doce a 10mM na água do mar (WAGNER & DIMATTIA, 2006). Logo, existe um gradiente de difusão contínuo e massivo do Ca^{2+} ambiental para dentro das células. Além disso, os peixes são ovíparos e, diferentemente dos mamíferos vivíparos cujos embriões se desenvolvem dentro do corpo materno, os embriões desses animais, desde o início da vida, estão circundados pelas águas que diferem enormemente em fontes absorvíveis de cálcio (YEUNG et al., 2012). Por isso, no ambiente aquático com suas altas concentrações de Ca^{2+} , a STC1 possui um papel crucial na homeostase mineral.

1.2.2. Stanniocalcina em mamíferos

Em animais terrestres, nunca foram identificados Corpúsculos de Stannius ou qualquer estrutura comparável. Além disso, nesse grupo animal, o principal hormônio responsável pelo controle do cálcio extracelular é o paratohormônio (PTH), cuja ação é francamente hipercalcemiante, ação inversa à da STC1. Essa diferença pode ser consequência do fato de que os animais terrestres enfrentam com maior frequência situações de hipocalcemia, e não possuem a capacidade, em situações normais, de se tornarem espontaneamente hipercalcêmicos. A concentração plasmática de cálcio nesses animais aumenta apenas transientemente após a ingestão de alimentos contendo cálcio e, em resposta a essa hipercalemia pós-prandial, a calcitonina é secretada para facilitar a transferência de Ca^{2+} aos ossos e, assim, diminuir a concentração de Ca^{2+} plasmática até níveis normais (ISHIBASHI & IMAI, 2002). Por isso, por muito tempo foi assumido que o gene para a STC1 havia se perdido durante a evolução.

No entanto, no início dos anos 90, estudos utilizando a STC1 de peixe demonstraram que o hormônio possuía atividade biológica em células de mamíferos, e que as funções da STC1 no metabolismo do cálcio vistas em peixes foram mantidas em mamíferos (LAFEBER et al., 1989; WAGNER et al., 1995; YOSHIKO et al., 1996). Esses dados estimularam a ideia de que poderia existir de um ortólogo da STC1 em mamíferos.

A existência da STC1 em mamíferos foi confirmada quando dois grupos independentes clonaram o cDNA da STC1 em camundongos e humanos (CHANG et al., 1995, 1996; OLSEN et al., 1996). Dois anos após a identificação da STC1 em mamíferos, estudos *in silico* baseados na busca de homólogos desse hormônio no programa BLASTn do NCBI (National Center for Biotechnology Information) encontraram, em humanos, o cDNA para um segundo hormônio relacionado, que foi chamado de STC2 (CHANG & REDDEL, 1998; DIMATTIA et al., 1998; ISHIBASHI et al., 1998; MOORE et al., 1999). A STC2, a partir disso, também foi encontrada em várias espécies de peixes (LUO et al., 2005). A STC2 apresenta apenas 30% de identidade com a sequência de aminoácidos da STC1 (Tabela 1); no entanto, todas as características estruturais importantes, como os limites entre éxons e introns, o local de glicosilação e a localização dos resíduos de cisteína, são conservados na STC1 e STC2. Análises filogenéticas e genômicas da estrutura dos genes mostram que a STC1 e a STC2 podem ter derivado a partir de um gene ancestral comum (WAGNER & DIMATTIA, 2006).

Tabela 1 - Comparação dos dois homólogos da stanniocalcina de mamíferos

	STC1	STC2
Resíduos de aminoácidos*	247	302
% Identidade com a STC de peixe*	53	34
Tamanho do mRNA*	2 e 4kb	2,2 e 4,4 kb
Número de éxons*	4	4
Mapeamento cromossômico*	8p11.2-p21	5q35
Características genômicas*	Repetições CAG, TATA box	Nenhuma
Localização celular	Osteoblastos, condrócitos, células de linhagem tumoral, mioblastos, cardiomiócitos, células da teca (ovário), rim, endotélio, neurônios	Células α -pancreáticas, células de linhagem tumoral
Indução do gene	Alta $[Ca^{2+}]$ extracelular, isquemia, hipertonicidade, lisofosfatidilcolina, calcitriol, hipóxia, PMA, LH	Dieta rica em fosfato, 17β -estradiol
Supressão do gene	Desconhecido	Dieta pobre em fosfato, camundongos HYP, calcitriol

PMA, phorbol 12-myristato 13-acetato, LH, hormônio luteinizante. * Dados de humanos

Devido à similaridade na sequência de aminoácidos e na conservação da posição dos resíduos de cisteína entre a STC1 e a STC2, poderia ser assumido que os dois hormônios apresentam as mesmas funções. No entanto, a STC2 possui uma molécula aproximadamente 20% mais comprida que a STC1, principalmente porque possui uma região C-terminal, que é rica em histidinas, estendida em relação à STC1. Além disso, estudos mostraram que a STC1 de mamífero inibe o transporte de Ca^{2+} através das brânquias nos peixes, enquanto a STC2 não apresenta nenhum efeito sobre este mecanismo (WAGNER & DIMATTIA, 2006 – Fig. 6). Ainda mais importante é o fato de que, nos estudos feitos até o momento, grande parte da STC1 foi localizada na mitocôndria (MCCUDDEN et al., 2002) enquanto que a STC2 foi localizada no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi em células neurais de camundongos (ITO et al., 2004). Isso indica que existem diferenças fundamentais de função entre os dois hormônios. Essa diferença é apoiada pelo fato de que a STC2 é incapaz de deslocar a STC1 em ensaios de ligação ao receptor (LUO et al., 2004; MCCUDDEN et al., 2002).

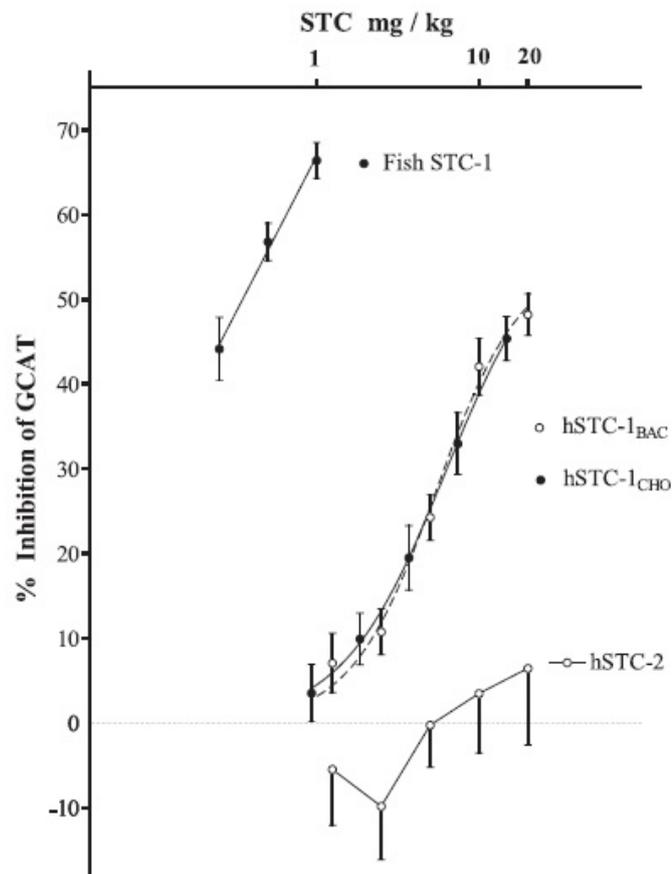


Figura 6 - Efeito comparativo da STC1 de peixe (Fish STC-1), da STC1 humana (hSTC-1) e da STC2 humana (hSTC-2) sobre o transporte de cálcio através das brânquias (GCAT) em peixes. Grupos de 10 trutas foram injetados com concentrações crescentes de cada preparação (i.e. STC-1, hSTC-1 ou hSTC2) e o grupo controle recebeu salina. Os peixes foram então colocados em aquários com água com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ para determinar a atividade do transporte do $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pelas brânquias. Essa atividade de transporte em cada peixe tratado com hormônio foi expressa como o percentual dos controles injetados com salina.

Alguns estudos sugerem que a função regulatória da STC1 sobre o metabolismo do Ca^{2+} e do fosfato (P_i) foi evolutivamente conservada de peixes a mamíferos. A STC1 de mamífero possui função na homeostase mineral assim como a STC1 dos peixes: ela age aumentando a reabsorção de fosfato nos rins de ratos (WAGNER et al., 1997) por meio de estimulação do transporte de fosfato no túbulo proximal pelo co-transportador $\text{Na}^+\text{-P}_i$ e age no aumento da excreção de cálcio e absorção de fosfato pelo intestinos de ratos e de porcos (MADSEN et al., 1998). No entanto, essas ações da STC1 não alteram os níveis de Ca^{2+} e de P_i sanguíneos, sugerindo uma ação local desse hormônio em mamíferos.

A hipótese de que a STC1 é um mediador local em mamíferos foi fortalecida pelo estudo que demonstrou a presença de mRNA da STC1 em osteoblastos e condrócitos de ratos (YOSHIKO et al., 2002). Além dessa ação local, estudos já reportaram que ocorre um aumento da expressão da STC1 em células MDCK (Madin-Darby canine kidney) quando estas são submetidas a um meio hipertônico e a um meio com alta concentração de Ca^{2+} (SAZONOVA et al., 2008; SHEIKH-HAMAD et al., 2000). O aumento da expressão da STC1 também já foi encontrado por Turner e colaboradores (2010) em rins de ratos que foram expostos a uma situação de privação de água. A relação entre a STC1 e o Ca^{2+} intracelular foi estreitada em um estudo que demonstrou que o tratamento de culturas de cardiomiócitos de ratos com STC1 cessou a contração por inibição das correntes de Ca^{2+} através dos canais do tipo L (SHEIKH-HAMAD et al., 2003). Por outro lado, existem poucas informações disponíveis sobre a função da STC2 na homeostase do $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_i$ em mamíferos. Já foram sugeridas funções biológicas complementares na regulação do transporte de fosfato pela STC1 e STC2, pois esta última inibiu em 38% a atividade do co-transportador $\text{Na}^+\text{-P}_i$ do tipo II, mais encontrado no túbulo proximal (ISHIBASHI et al., 1998). No entanto, nenhum outro estudo reportou algum efeito da STC2 sobre o metabolismo do cálcio em mamíferos.

Em mamíferos, os genes da STC1 e da STC2 são amplamente expressos, e a expressão de cada um dos hormônios se sobrepõe em alguns tecidos, o que sugere que elas podem formar um heterodímero (ISHIBASHI & IMAI, 2002), como a ativina e a inibina. O gene da STC1 é expresso em tecidos tão diversos quanto o coração, os pulmões, a tireoide, o fígado, as glândulas adrenais, os rins, a próstata e os ovários, onde os níveis de expressão da STC1 são especialmente altos (CHANG et al., 1995; VARGHESE et al., 1998). Já as mais altas expressões da STC2 em mamíferos foram encontradas no pâncreas, no baço, nos rins e no músculo esquelético (DIMATTIA et al., 1998; ISHIBASHI et al., 1998). Hoje em dia sabe-se que a STC1 e o seu parólogo STC2 são virtualmente produzidos em todos os tecidos (YEUNG et al., 2012). De forma importante, em situações fisiológicas normais, tanto a STC1 quanto a STC2 não são encontradas na corrente sanguínea de mamíferos, e a STC2 também não é encontrada na circulação dos peixes. Esse fato, somado à comprovação da existência do cDNA de STCs em diferentes tecidos de mamíferos, sugere que esses hormônios agem como fatores parácrinos ou autócrinos (DE NIU et al., 2000).

A ideia de que as STC1 e STC2 possuem ações parácrinas ou autócrinas e não uma ação endócrina como aquela vista nos peixes foi corroborada por achados que mostram o sequestro desses hormônios por organelas intracelulares. Em células que armazenam e liberam gordura, como os adipócitos e as células esteroideogênicas, as gotículas de lipídio/colesterol (LSD – *lipid storage droplet*) foram identificadas como um alvo subcelular da STC1 (LUO et al., 2004; PACIGA et al., 2003 e 2004). Locais de ligação de alta afinidade para a STC1 também foram identificados nas membranas mitocondriais de hepatócitos e células de néfrons renais (MCCUDDEN et al., 2002). O hormônio chega ao interior da mitocôndria através de sítios de ligação de alta afinidade e/ou receptores na membrana celular e nas membranas mitocondrias externa/interna que garantem o sequestro da STC1 para a matriz interna da mitocôndria. Uma terceira via, caracterizada em alvéolos mamários de lactantes, implica o sequestro da STC1 pelo núcleo (HASILO et al., 2005). Já em estudos de imunofluorescência, ITO e colaboradores (2004) demonstraram a co-localização da STC2 com marcadores do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi.

Dado o amplo padrão de expressão das STC1 e da STC2 em mamíferos, é plausível imaginar que esses hormônios também ampliaram suas funções nesse grupo animal. Esses hormônios parecem exercer, por exemplo, um papel importante no desenvolvimento embrionário. Ratos de linhagens transgênicas que superexpressam STC1 e STC2 desde o início do desenvolvimento apresentam um fenótipo anão e retardo no desenvolvimento (FILVAROFF et al., 2002; GAGLIARDI et al., 2005), o que sugere que esses hormônios exercem efeitos negativos no desenvolvimento ósseo, cartilaginoso e muscular. Além desse efeito, durante o desenvolvimento embrionário, já foram postulados possíveis papéis para a STC1 na sinalização mesenquimal-epitelial durante o desenvolvimento urogenital (STASKO & WAGNER, 2001b), na osteogênese (YOSHIKO et al., 2002), na formação e na padronização do esqueleto e articulações (STASKO & WAGNER, 2001a) e no desenvolvimento ósseo e muscular (JIANG et al., 2000).

O padrão de expressão da STC1 é sexualmente dimórfico durante o desenvolvimento gestacional e pós-natal (STASKO & WAGNER, 2001b) e, esse dado, juntamente com o alto nível de expressão desse hormônio encontrado no ovário (VARGHESE et al., 1998), também levantou questionamentos sobre o papel da STC1 na função reprodutiva. Fêmeas transgênicas que superexpressam STC1 desde o início do desenvolvimento apresentam uma habilidade reprodutiva severamente comprometida (VARGHESE et al., 2002). O estudo de FILVAROFF e colaboradores (2002) também reportou que um fenótipo reprodutivo não foi observado nas fêmeas transgênicas que superexpressavam STC1, sugerindo que a exposição a altos níveis de STC1 durante a embriogênese pode levar à redução do potencial reprodutivo das fêmeas. Notavelmente, os níveis de STC1, que geralmente não são detectáveis na corrente sanguínea, o são durante a gestação (DEOL et al., 2000).

Estudos sugerem que a STC1 também possui um papel importante no sistema nervoso. A STC1 é expressa em neurônios totalmente diferenciados no sistema nervoso central (SNC) (ZHANG et al., 1998), e culturas de uma linhagem celular derivada de crista neural humana, chamada Paju, expressam STC1 em condições hipercalcêmicas (ZHANG et al., 2000). A expressão da STC1 aumenta em neurônios de cérebros isquêmicos de ratos e de humanos e em células de glioblastoma submetidas à hipóxia (LAL et al., 2001), e a expressão da STC1 no epitélio do plexo coróide também sugere que esse hormônio tenha um papel na regulação da concentração de cálcio e de fosfato no fluido cerebrospinal.

A quantidade crescente de informação sobre a expressão diferencial da STC1 e da STC2 em diferentes tipos de tumores também demonstra um importante papel desses hormônios na carcinogênese. Já foi observado um aumento na expressão da STC1, por exemplo, no câncer colorretal, em carcinomas hepatocelulares, em câncer pulmonar de células pequenas, em tumores ovarianos, em carcinomas de mama e em pacientes com leucemia. Uma expressão aberrante da STC2 também já foi estudada em várias amostras de tumores cancerígenos humanos, como no câncer gástrico, em neuroblastomas, no câncer de próstata resistente à castração, no câncer de mama, no retal, no câncer de células escamosas do esôfago e em carcinomas de células renais (YEUNG et al., 2012).

Ainda em relação ao câncer, estudos clínico-patológicos correlacionaram altos níveis de expressão da STC1 e da STC2 em diferentes tipos de câncer a um prognóstico ruim. Pacientes com certos tipos de tumores, diferentemente do que ocorre em uma situação fisiológica padrão, apresentam concentrações detectáveis de STC1 na corrente sanguínea (ISHIBASHI & IMAI, 2002), e uma alta expressão da STC1 no sangue periférico foi relacionada a uma baixa taxa de sobrevivência (TOHMIYA et al., 2004). Com base na expressão gênica diferencial e nos dados sobre prognóstico, a STC1 e a STC2 são consideradas marcadores moleculares em vários tipos e estágios de cânceres. Esses dados estimularam estudos que demonstram ligações regulatórias e funcionais entre a expressão das STCs e fatores associados com a angiogênese; por exemplo, a expressão da STC1 seria estimulada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (LIU et al., 2003), e a STC2 estimularia a invasão endotelial (LAW & WONG, 2010). As STC1 e STC2 também estimulariam a proliferação celular e, conseqüentemente, o crescimento do tumor já que tanto efeitos pró-apoptóticos quanto anti-apoptóticos já foram apresentados por esses hormônios (YEUNG et al., 2012). Por fim, as expressões da STC1 e da STC2 foram associadas com o desenvolvimento de duas condições microambientais que têm profundas conseqüências no crescimento tumoral, a hipóxia e o estresse do retículo endoplasmático (ITO et al., 2004), e, assim, esses hormônios parecem possuir papel positivo na migração e invasão dos tumores.

1.2.3. Ações das Stanniocalcinas sobre o Metabolismo Intermediário em Mamíferos

Nos últimos anos, alguns resultados sobre a influência das STCs sobre o metabolismo intermediário têm sido reportados. Filvaroff e colaboradores (2002) geraram camundongos transgênicos que expressavam a STC1 humana sob o controle de um promotor músculo específico, o que faz com que eles apresentem altos níveis de STC1 no músculo esquelético. Esses animais apresentaram um fenótipo desperdiçador de energia, ou seja, apresentavam hiperfagia, 13,8% de aumento no consumo de oxigênio, tolerância à glicose aumentada e decréscimo significativo no peso corporal. Os camundongos transgênicos também mostravam uma hipertrofia mitocondrial nos locais de expressão transgene, sem nenhum prejuízo à integridade dessas organelas. Como exposto anteriormente, locais de ligação de alta afinidade para a STC1 já haviam sido identificados nas membranas mitocondriais de hepatócitos e células dos néfrons renais, e 90% do hormônio foram localizados na matriz mitocondrial destas células (MCCUDDEN et al., 2002), demonstrando que essa organela sequestra a STC1 para seu interior.

McCudden et al. (2002) demonstraram efeitos estimulatórios, que são concentração-dependentes, da STC1 sobre a transferência de elétrons mitocondrial, sugerindo que a STC1 poderia estar aumentando a síntese de ATP. Esses efeitos mitocondriais da STC1 estariam contribuindo para o aumento de consumo de comida e de oxigênio visto nos camundongos transgênicos (FILVAROFF et al., 2002). Trabalhos subsequentes com mitocôndrias isoladas de fígado e de músculo gastrocnêmio de ratos também obtiveram sucesso em demonstrar um aumento no consumo de oxigênio após a exposição à STC1; no entanto esse aumento foi detectado apenas no estado 3 da cadeia respiratória e não no estado 4 (ELLARD et al., 2007). Nesse mesmo trabalho, foi verificado que a incubação com 500nM de STC1 diminuiu significativamente a razão ADP:O nas mitocôndrias de ambos os tecidos, sugerindo uma produção menos eficiente de ATP na presença do hormônio, e também foi verificado que os nucleotídeos trifosfatos, ATP e GTP, reduzem significativamente a ligação da STC1 aos receptores mitocondriais. Apesar dos resultados controversos, o aumento no consumo de oxigênio, em conjunto com a estimulação da transferência de elétrons mitocondrial, demonstra o papel da STC1 na fosforilação oxidativa (ELLARD et al., 2007; MCCUDDEN et al., 2002). Todos esses resultados evidenciam a importância da STC1 na regulação do metabolismo celular.

A STC1 parece possuir um papel importante também no metabolismo de lipídios. Uma ação endócrina/exócrina dinâmica desse hormônio já foi constatada durante a gestação e o período pós-natal. Nesse período, a concentração plasmática de STC1 é detectável e as glândulas mamárias são um dos órgãos alvo dessa STC1 circulante, sendo, inclusive, esse hormônio encontrado no leite materno (HASILO et al., 2005). Quando os níveis de STC1 no soro de camundongos fêmeas que estão lactando

são diminuídos através de imunização passiva, ocorre redução marcante no peso corporal e na absorção de lipídios pelo trato gastrointestinal de seus filhotes (ZAIDI et al., 2006). Esse resultado sugere que, durante o processo de crescimento, a STC1 pode ter importantes funções no intestino, não só regulando o metabolismo do cálcio/fosfato, mas também a absorção de gorduras.

Ainda em relação ao metabolismo de lipídios, o mRNA da STC1 e os receptores para o hormônio já foram detectados em adipócitos (SERLACHIUS & ANDERSSON, 2004), assim como variantes da STC, chamados de bigSTCs, também já foram encontradas nessas células (PACIGA et al., 2005). Serlachius e Andersson (2004) observaram um aumento na expressão da STC1 nos adipócitos que estão no estágio final de maturação e esses autores relacionaram a presença da STC1 com a resistência dos adipócitos à apoptose. Além disso, o hormônio STC1 parece estimular a lipogênese no tecido hepático e muscular de ratos (GONÇALVES, 2012). Esses resultados sugerem o envolvimento da STC1 com a homeostase do tecido adiposo.

Resultados preliminares do nosso laboratório também demonstram um efeito das STCs no metabolismo da glicose. A STC1 diminuiu a capacidade gliconeogênica a partir de glutamina na porção externa da medula renal de ratos, região que compreende o túbulo contorcido proximal, cuja alta concentração de mRNA da STC1 já havia sido demonstrada por Turner e colaboradores (2010). Esse hormônio também diminuiu a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) na porção externa da medula renal dos ratos, e diminuiu a expressão da isoforma mitocondrial (*pck2*) da PEPCK nesse segmento. No entanto, a STC1 aumentou significativamente os níveis de mRNA da isoforma citosólica (*pck1*) da PEPCK na medula renal de ratos. A STC1 também diminuiu a incorporação de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ no fígado de ratos, e diminuiu a atividade enzimática da piruvato cinase (PK) no músculo gastrocnêmio (GONÇALVES, 2012). Esses resultados, coletivamente, sugerem o envolvimento da STC1 na regulação da homeostase da glicose em ratos.

Estudos sobre uma possível influência da STC2 no metabolismo intermediário ainda são escassos. No entanto, de maneira muito importante, estudos imuno-histoquímicos revelaram que a STC2 é expressa nas células- α das ilhotas pancreáticas e que, nestas células, o hormônio está colocalizado com as células secretoras de glucagon (MOORE et al., 1999). Esse resultado está de acordo com os altos níveis de expressão do mRNA da STC2 encontrado no pâncreas (ISHIBASHI et al., 1998). Outro trabalho mostra que a STC2, na dose de 10ng/mL, diminuiu a incorporação de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ no músculo gastrocnêmio de ratos, mas aumentou a atividade da enzima PK no fígado e no músculo dos mesmos (GONÇALVES, 2012). Esse resultado sugere que a STC2 também possui um papel na homeostase da glicose.

O fígado e o músculo esquelético já foram apontados como alvos das STC1 e STC2. Em 2002, McCudden e colaboradores utilizaram a proteína STC1 fusionada à fosfatase alcalina (STC1-AP) para

demonstrar a existência de receptores para este hormônio em diferentes tecidos. Os autores constataram, *in situ*, ligação de alta afinidade de STC1-AP na superfície celular do fígado. Além disso, embora os níveis de mRNA de STC1 sejam relativamente baixos no músculo esquelético, foi observado que, após a injeção de STC1 humana marcada radioativamente, um acúmulo da STC1 é percebido no músculo, indicando a presença de sítios de ligação ao hormônio (DE NIU et al., 2000). Como o músculo corresponde a mais de 50% do *pool* total de aminoácidos livres do corpo, e o fígado é o repositório das enzimas do ciclo da ureia, que são necessárias para a disponibilidade do nitrogênio dos aminoácidos, espera-se que esses dois órgãos tenham um papel principal na determinação dos níveis circulantes e no *turnover* dos aminoácidos (FELIG, 1975). Considerando que, apesar da existência de evidências sobre a influência das STC1 e STC2 sobre o metabolismo de mamíferos, ainda não existem estudos que abordem, especificamente, os efeitos desses hormônios sobre o metabolismo de aminoácidos e proteínas, o presente trabalho se propõe a investigar essa lacuna existente no conhecimento sobre as STCs.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo dessa dissertação foi estudar, *in vitro*, o efeito de diferentes doses dos hormônios STC1 e STC2 humanos (hSTC1 e hSTC2) sobre o metabolismo de aminoácidos em tecidos de ratos com o propósito de demonstrar os efeitos metabólicos destes hormônios.

2.1. Objetivos específicos

Determinar, no fígado e no músculo gastrocnêmio de ratos, os efeitos da STC1 e STC2 humana (doses de 0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a:

- a) captação dos análogos de aminoácidos ácido 2-(metilamino)isobutírico (^{14}C -MeAIB) e ácido 2-aminoisobutírico (^{14}C -AIB);
- b) oxidação dos aminoácidos ^{14}C -alanina e ^{14}C -leucina;
- c) atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) mitocondrial;
- d) formação de ^{14}C -glicose a partir do aminoácido alanina;
- e) síntese de ^{14}C -glicogênio a partir do aminoácido alanina;
- f) síntese de ^{14}C -lipídios totais a partir do aminoácido alanina;
- g) síntese de ^{14}C -proteínas a partir dos aminoácidos alanina e leucina;
- h) atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para a realização do objetivo acima proposto, foram utilizados quarenta e oito ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) pesando aproximadamente 300 ± 50 g. Esses animais foram obtidos no CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais em Laboratório) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Após a retirada dos animais do CREAL, os mesmos foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 21°C e ciclo de 12h claro/12h escuro. Os ratos foram mantidos em caixas contendo quatro animais por caixa, recebendo água e alimento *ad libitum* até o momento da execução de cada procedimento experimental.

Os procedimentos experimentais aos quais os animais foram submetidos obedeceram às normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (nº 20358).

3.2. Procedimentos Experimentais

Os animais utilizados foram mortos por decapitação em guilhotina, procedimento realizado sempre no início da manhã e cujo grau de severidade é sem recuperação. Após a decapitação, o fígado e o músculo gastrocnêmio de ambas as patas foram rapidamente excisados de todos os animais. Esses tecidos foram fatiados, em pedaços de aproximadamente 3mm feitos com lâmina de aço, sobre placas de Petri umedecidas com tampão Krebs-Henseleit Bicarbonato (KHB) (NaCl 118mM, KCl 4,8mM, CaCl₂ 1,3mM, KH₂PO₄ 1,2mM, MgSO₄ 1,2mM e NaHCO₃ 24,8mM, pH 7,4) gelado. É importante salientar que, no presente trabalho, as frações do gastrocnêmio incubadas possuíam tanto fibras brancas quanto vermelhas juntas.

Antes da realização de todas as técnicas experimentais utilizadas no presente trabalho, os tecidos fatiados foram adicionados a tubos contendo 1mL de KHB com 1% de albumina sérica bovina (BSA), pH 7,4, e esses tubos foram aerados com gás carbogênio (O₂:CO₂, 95:5%, v/v) durante 30 segundos para a substituição da fase gasosa. Esses tecidos passavam, então, por uma pré-incubação em banho metabólico tipo Dubnoff a 37°C durante 15 minutos sob agitação constante.

Após o período de pré-incubação, os tecidos provenientes de um mesmo animal foram divididos em sete grupos: um grupo controle, que foi incubado sem a presença de nenhum hormônio exógeno; três grupos que foram incubados com a STC1 humana nas doses de 0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL; e três grupos que foram incubados com a STC2 humana nas doses de 0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL (Recombinant Human STC1 and STC2, HEK 293 cell line, RayBiotech Inc. USA). As doses foram determinadas segundo trabalho de De Niu et al. (2000).

3.3. Captação de Aminoácidos

Para acessar os efeitos das diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação do ácido 2-(metilamino) isobutírico (¹⁴C-MeAIB) e do ácido 2-aminoisobutírico (¹⁴C-AIB), que são análogos não-metabolizáveis para o modelo de transporte de aminoácidos A e A mais ASC, respectivamente, os tecidos, aproximadamente 300mg de músculo ou de fígado previamente pré-incubados, foram inseridos em tubos contendo 1mL de KHB 1% BSA, 0,2μCi de ¹⁴C-MeAIB (Du Pont – 2.1GBq/mmol, 56mCi/mmol) por tubo ou 0,2μCi de ¹⁴C-AIB (Amersham International – 2.22GBq/mmol, 60mCi/mmol) por tubo e as diferentes concentrações (0,01ng/mL; 0,1ng/mL e 10ng/mL) de STC1 e de STC2.

Após a adição dos tecidos ao meio de incubação, foi realizada a substituição da fase gasosa por carbogênio (O₂:CO₂, na proporção 95:5%, v/v) e a incubação a 37°C em banho metabólico do tipo Dubnoff por 60 minutos. Ao final do tempo de incubação, os tubos foram imediatamente imersos em recipiente com gelo para interromper a reação de captação do ¹⁴C-MeAIB e do ¹⁴C-AIB. As amostras foram removidas do meio de incubação, lavadas em solução KHB gelada com o objetivo de retirar o excesso de radioatividade adsorvida ao tecido, secas em papel filtro e colocadas em frascos com tampa rosca contendo 1mL de água destilada.

Estes frascos foram congelados e fervidos alternadamente por três vezes para romper as células e liberar conteúdo captado pelo tecido hepático e muscular. O conteúdo liberado foi considerado o meio interno e o meio de incubação, o externo. Alíquotas de 100 μ L do meio interno e do meio externo foram, então, colocadas em 2,5mL de líquido de cintilação (Tolueno -Triton X100 (2:1) – PPO 4% e POPOP 0,01%) para medida de radioatividade em espectrofotômetro de cintilação líquida LKB-Wallac.

Os resultados da captação foram expressos pela medida da radioatividade contida no meio interno (aminoácidos captados pelo tecido) e no meio externo (meio de incubação) (T/M razão entre dpm/mL de meio interno e dpm/mL de meio externo), conforme descrito por Machado e colaboradores (1991).

3.4. Oxidação de Aminoácidos

Para determinar se os hormônios STC1 e STC2 afetavam a oxidação dos aminoácidos alanina e leucina, os tecidos hepático e muscular, previamente fatiados e pré-incubados, foram colocados em vidros com tampa de borracha que continham 1mL de solução KHB 1% BSA pH 7,4 acrescido de: 1) 0,15 μ Ci de L-[U-¹⁴C]Alanina (Amersham International - 5.85GBq/mmol, 158 mCi/mmol), 10mM de L-Alanina (Merck) e as duas isoformas de STC nas doses de 0,01; 0,1 e 10ng/mL; ou 2) 0,15 μ Ci de L-[U-¹⁴C]Leucina (Amersham International – 11.7GBq/mmol, 315mCi/mmol), 10mM de L-Leucina (Merck) e a STC1 ou STC2 nas doses de 0,01; 0,1 e 10ng/mL. Vidros em formato de “J” com um poço que continha uma tira de papel 3MM Whatman foram fixados às tampas de borracha e permaneciam dentro do frasco durante o período de incubação sem encostar na solução de KHB.

Os tecidos adicionados aos vidros foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, na proporção 95:5%, v/v) por 30 segundos e as tampas foram fechadas e vedadas com parafilme. A incubação ocorreu em banho metabólico tipo Dubnoff a 37°C com agitação constante por 120 minutos. Após esse período, a reação de oxidação foi interrompida com a administração de uma injeção, através da tampa de borracha, de 0,25mL de TCA 50% ao meio de incubação, e, nos poços, foram injetados 0,25mL de NaOH 2M (TORRES et al., 2001).

Os tubos foram, então, deixados à temperatura ambiente por 24 horas para que o ¹⁴CO₂ formado fosse captado pelo papel 3MM Whatman. Após este período, os vidros em formato de “J”

foram retirados e inseridos em frascos de contagem com 2,5mL de líquido de cintilação (Tolueno - Triton X100 (2:1) – PPO 4% e POPOP 0,01%). Esses frascos foram levados a um contador LKB-Wallac, para determinar a formação do $^{14}\text{CO}_2$. Os resultados foram expressos em μmoles de ^{14}C -alanina ou ^{14}C -leucina incorporados em $^{14}\text{CO}_2$ por grama de tecido por hora.

3.5. Atividade Enzimática da Enzima Malato Desidrogenase (MDH) (E.C.1.1.1.37)

A ação dos hormônios STC1 e STC2 sobre a atividade da enzima malato desidrogenase foi avaliada incubando-se o tecido hepático, após o período de pré-incubação, durante 60 minutos a 37°C em 1mL de solução KHB 1% BSA acrescida do hormônio STC1 ou STC2 nas doses de 0,01ng/mL; 0,1ng/mL ou 10ng/mL.

a) Separação da Fração Mitocondrial

As mitocôndrias presentes nos tecidos incubados foram isoladas pelo método de centrifugação diferencial. Para isso, os tecidos foram homogeneizados em um meio para isolamento (0,07M de sacarose, 5mM de Tris, 1mM de EDTA e 0,5mg/mL de BSA; pH 7,4) utilizando um homogeneizador de Teflon tipo Potter – Elvehjem. O homogenado foi centrifugado a $600 \times g$, a 4°C por 10 minutos (Du Pont Instruments - Sorvall RC-5B) para separar as matérias insolúveis. O sobrenadante resultante foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C , e o precipitado dessa centrifugação, que contém a fração mitocondrial da amostra, foi suspenso em tampão contendo 0,07M de sacarose e 5mM de Tris e, depois, utilizado para a determinação das proteínas totais da amostra (BRADFORD, 1976) e da atividade enzimática da MDH.

b) Determinação da Atividade Enzimática

A atividade da enzima MDH foi determinada segundo método descrito por Ochoa (1955). Esse método é baseado na reação de interconversão do oxaloacetato a L-malato utilizando NADH como sua coenzima:



A velocidade da reação é determinada pela medida do decaimento da absorbância em 340nm resultante da oxidação do NADH. Portanto, utilizou-se como meio de reação 2,75mL de Tampão

Fosfato (0,1M pH 7,4), 100 μ L de NADH (3,74mM, dissolvido no Tampão Fosfato) e 100 μ L de Ácido Oxaloacético (6mM, dissolvido no Tampão Fosfato) que foram pipetados em uma cubeta de quartzo. Essa cubeta foi incubada no espectrofotômetro (PG Instruments T-60 UV-Visible Spectrophotometer) por 3 minutos para alcançar o equilíbrio da temperatura em 25°C e estabelecer o branco. Então, 50 μ L do homogenado, que contém a MDH, foi adicionado à cubeta, e o decaimento da absorbância foi monitorado a cada 15 segundos por um período de tempo de 2 minutos.

A atividade específica da MDH foi expressa em Unidades de MDH por miligrama de proteína (U/mg), considerando-se que uma unidade da enzima é definida como a concentração de MDH que causa um decaimento na densidade óptica de 0,01 por minuto sob as condições acima especificadas.

3.6. Formação de Glicose a partir de Alanina

Para determinar os efeitos da STC1 e da STC2 sobre a via da gliconeogênese a partir do aminoácido alanina, o fígado fatiado, após sofrer a pré-incubação, foi colocado em tubos plásticos contendo 0,15 μ Ci de L-[U-¹⁴C]Alanina (Amersham International, 5.85GBq/mmol, 158 mCi/mmol) por tubo, 5mM de L-Alanina (Merck) mais as doses de 0,01; 0,1 e 10ng/mL de STC1 ou STC2 e 1mL de solução KHB gelada. Esses tubos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5% v/v), e passaram por uma incubação de 120 minutos em banho metabólico, a 37°C, sob agitação constante.

Terminado o período de incubação, os tecidos foram separados do meio de incubação. Os meios de incubação foram primeiramente centrifugados a 4000 rpm por 2 minutos (Centrífuga Eppendorf 5415C) e, então, a uma alíquota de 300 μ L do sobrenadante, foram adicionados 75 μ L de Hidróxido de Bário [Ba(OH₂)] saturado e 75 μ L de Sulfato de Zinco (ZnSO₄) 2%. As amostras foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante resultante foi utilizado para a verificação da ¹⁴C-Glicose formada pela técnica de cromatografia em camada delgada.

Essa técnica inicia com a pipetagem de 10 μ L das amostras em cromatofolhas de sílica (Merck – TLC Silica gel 60) juntamente com 20 μ L de um padrão de glicose (100mg/100mL). Essas placas foram inseridas em uma cuba de vidro preenchida com 200mL da solução carreadora (N-Butanol: Álcool Etilíco 95%: Ácido Acético 5,4% - 100:63,2:36,8), e esperou-se em torno de 30 minutos para que a fase líquida migrasse até o fim da placa de sílica. As placas foram retiradas da cuba e, depois de secas, foram borrifadas com solução reveladora (Ácido Sulfúrico Concentrado: 4-

Methoxybenzaldeído: Álcool Etílico 95% - 1:1:18) que, depois de um período de 20 minutos a 50°C em estufa, revelou as manchas de glicose existentes na placa.

As manchas foram recortadas da placa e os pedaços de placa de sílica com a ¹⁴C-Glicose foram colocados em tubos para contagem com 2,5mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton X-100 2:1 + PPO 0,4% + POPOP 0,01%) para a determinação da radioatividade. Esses tubos foram mantidos 24 horas sob refrigeração, e, então, procedeu-se a contagem das amostras em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac. Os resultados foram expressos em μmoles de ¹⁴C-Glicose formada por grama de tecido por hora de incubação.

3.7. Incorporação de Alanina em Glicogênio

A determinação da síntese de glicogênio a partir do aminoácido alanina foi realizada utilizando-se aproximadamente 300mg de fígado que, após a pré-incubação, foram adicionadas a frascos contendo 1mL de KHB 1% BSA pH 7,4, acrescido de 0,15μCi de L-[U-¹⁴C]Alanina (Amersham International, 5.85GBq/mmol, 158mCi/mmol) e 5mM de L-Alanina (Merck) na presença das isoformas das STC1 ou STC2 (0,01; 0,1 e 10 ng/ml). A seguir, foi realizada a substituição da fase gasosa por carbogênio (O₂:CO₂, 95:5%, v/v), e, então, os tubos foram incubados em banho metabólico tipo Dubnoff por 120 minutos a 37°C sob agitação constante.

Após o tempo de incubação, as reações metabólicas foram interrompidas em banho de gelo e os tecidos foram lavados em KHB gelado, secos em papel filtro, colocados em tubos contendo 200μL de Hidróxido de Potássio (KOH) 0,5M e incubados a 80°C durante 60 minutos. Depois dessa incubação, foi adicionado às amostras Etanol 99°G.L. que, após uma fervura a 65°C por 10 minutos, seguida de um banho de gelo, levou à precipitação do glicogênio.

Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5415C), e o precipitado resultante recebeu 1mL de Etanol 70%. Esse procedimento foi repetido por três vezes, e o último precipitado restante foi dissolvido em 200μL de água Milli-Q. Essas amostras foram colocadas em frascos de contagem contendo 2,5mL de líquido de cintilação (Tolueno - Triton X100 2:1 – PPO 0,4% e POPOP 0,01%) para a determinação do ¹⁴C-glicogênio formado em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac. Os resultados foram expressos em μg de ¹⁴C-Alanina incorporados em glicogênio por grama de tecido por tempo de incubação.

3.8. Incorporação de Alanina em Lipídios

Para determinar os efeitos da STC1 e STC2 sobre a síntese de lipídios a partir do aminoácido alanina, o fígado fatiado (aproximadamente 300mg), após sofrer a pré-incubação, foi colocado em tubos plásticos contendo 0,15 μ Ci de L-[U-¹⁴C]Alanina (Amersham International, 5.85GBq/mmol, 158 mCi/mmol) por tubo, 5mM de L-Alanina (Merck), as doses de 0,01; 0,1 e 10ng/mL de STC1 e STC2 e 1mL de solução KHB gelada. Esses tubos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5% v/v) e passaram por uma incubação de 60 minutos em banho metabólico tipo Dubnoff, a 37°C, sob agitação constante.

Ao final do tempo de incubação, os tubos foram imediatamente imersos em recipiente com gelo para interromper a reação de síntese de lipídios. Os tecidos foram lavados em solução KHB gelada, pH 7,4, secos em papel filtro, e, então, homogeneizados em solução de clorofórmio-metanol (2:1; v/v) com o intuito de extrair os lipídios (FOLCH et al., 1957). O homogeneizado resultante recebeu 1mL de solução salina (NaCl 0,9%), sofreu uma centrifugação de 10 minutos a 377 x g (Centrífuga MTD III Plus) e a fase inferior foi transferida para frascos de cintilação.

Após a evaporação do clorofórmio, os ¹⁴C-lipídios foram dissolvidos em 5mL do coquetel de cintilação (Tolueno -Triton X100 (2:1) – PPO 4% e POPOP 0,01%), e a radioatividade foi contada em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac. Os resultados foram expressos como μ moles de ¹⁴C-Alanina incorporados em ¹⁴C-lipídios totais por grama de tecido por hora de incubação.

3.9. Incorporação de Aminoácidos em Proteínas

O efeito das diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a síntese de proteínas foi determinado segundo método descrito por Richardson e colaboradores (1997). Após o período de pré-incubação, as amostras dos tecidos hepático e muscular (100mg) foram colocadas em tubos contendo 1mL de solução KHB 1% BSA gelada acrescida de: 1) 0,15 μ Ci de L-[U-¹⁴C]Alanina (Amersham International - 5.85GBq/mmol, 158mCi/mmol), 5mM de L-Alanina (Merck), 1mM de Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) e as concentrações de 0,01; 0,1 e 10ng/mL das STC1 e STC2; ou 2) 0,15 μ Ci de L-[U-¹⁴C]Leucina (Amersham International – 11.7GBq/mmol, 315mCi/mmol), 5mM de L-

Leucina (Merck), 1mM de PMSF mais a STC1 ou a STC2 nas concentrações de 0,01; 0,1 e 10ng/mL. Esses tubos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5% v/v), as tampas foram fechadas e vedadas com parafilme, e, então, foi realizada uma incubação por 180 minutos, a 37°C com agitação constante.

Ao término do tempo de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. Para a retirada do excesso de radioatividade dos tecidos, as amostras foram lavadas com solução KHB pH 7,4 gelada, após foram secas em papel filtro e colocadas em frascos contendo 0,5mL de água destilada. Esses tecidos foram submetidos à homogeneização com um macerador de tecidos (Omni Mixer), sendo, então, o homogeneizado utilizado para determinar a incorporação da alanina ou da leucina em proteínas.

Para a quantificação das ¹⁴C-proteínas sintetizadas, 200μL das amostras foram aplicados em quadrados de 2 x 2cm de papel Whatman 3MM. Após a secagem das amostras, os papéis foram incubados em Ácido Tricloroacético (TCA) 10% por 10 minutos, para que ocorresse a precipitação das ¹⁴C-proteínas. Posteriormente, os papéis foram lavados em álcool 95% e, em seguida, em éter, para eliminar os lipídios. Quando já estavam secos, os papéis foram submersos em 10mL de líquido de cintilação (Tolueno -Triton X100 (2:1) – PPO 4% e POPOP 0,01%) e a radioatividade quantificada em contador LKB-Wallac. Os resultados foram expressos em μmoles de L-[U-¹⁴C]Alanina ou de L-[U-¹⁴C]Leucina incorporada em proteínas por grama de tecido por hora.

3.10. Atividade da Bomba Na⁺/K⁺-ATPase

Com o objetivo de avaliar os efeitos da STC1 e da STC2 sobre a atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase, as fatias de fígado, após a pré-incubação, foram primeiramente secas em papel filtro e, após, colocadas em tubos de plástico contendo 1mL de solução KHB 1% BSA acrescida do hormônio STC1 ou STC2 nas doses de 0,01ng/mL; 0,1ng/mL ou 10ng/mL e de 0,1mM de PMSF. Esses tubos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, na proporção 95:5%, v/v) e incubados durante 60 minutos a 37°C em banho metabólico.

a) Preparação das Membranas Plasmáticas

Após a incubação com os hormônios, as amostras de fígado foram homogeneizadas em Tampão de Homogeneização gelado (100mM de Tris, 5mM de EDTA, 250mM de sacarose e 1mM de PMSF), pH 7,4, utilizando um homogeneizador de Teflon tipo Potter – Elvehjem. Esses

homogeneizados foram centrifugados, primeiramente, a 1.000 x g, a 4°C por 10 minutos em uma centrífuga refrigerada (Du Pont Instruments - Sorvall RC-5B). O sobrenadante resultante foi centrifugado a 40.000 x g por 25 minutos a 4°C, e o precipitado dessa segunda centrifugação foi lavado duas vezes em Tampão de Homogeneização. Por fim, o precipitado foi ressuspenso em 0,5mL de Tampão de Homogeneização e armazenado a -20°C, por uma semana, até os ensaios de determinação da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase e da determinação das proteínas via método de Bradford (1976).

b) Ensaio da Enzima Na⁺/K⁺-ATPase

A determinação da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase foi realizada segundo o método descrito por Esmann (1988). A atividade máxima dessa enzima foi determinada pela diferença de produção de fosfato entre uma reação realizada em 180µL de Meio de Incubação (50mM de Tris-base, 80mM de NaCl, 5mM de MgCl₂, 10mM de KCl e 5mM de EGTA, pH 7,4) contendo 30mM de ouabaína, inibidor específico dessa enzima, e a uma reação em presença do mesmo Meio de Incubação porém sem ouabaína. Para isso, os tubos contendo esses Meios de Incubação acrescidos de 60µL da amostra foram pré-incubados por 5 minutos a 30°C. Passado esse tempo, a reação foi iniciada adicionando, nos tubos contendo ambas as soluções, 20µL de ATP 30mM, e, então, os mesmos foram mantidos em banho metabólico a 30°C durante 30 minutos. Após esse período, foram adicionados aos tecidos 200µL de TCA 10% com o objetivo de parar a reação enzimática, e as amostras foram mantidas em gelo até a determinação do fosfato liberado durante a reação.

c) Dosagem de Fosfato Inorgânico

Para a determinação do fosfato inorgânico (P_i) produzido a partir da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, foi utilizado o método de Chan e colaboradores (1986). As amostras resultantes do ensaio enzimático (40µL) foram adicionadas à 360µL de água MilliQ e à 1mL de Solução de Verde de Malaquita (Verde de Malaquita, Água MilliQ, Molibdato de Amônio e Álcool Polivinílico - 2:2:1:1, v:v). Após 10 minutos, foram realizadas as leituras das absorbâncias (630nm) das amostras em espectrofotômetro (PG Instruments T-60 UV-Visible Spectrophotometer), e a concentração de P_i para cada amostra foi calculada através da equação da reta dada pela curva padrão de Fosfato de Potássio Dibásico (K₂HPO₄ - 200nM). Os valores finais da atividade da bomba de Na⁺/K⁺ ATPase foram expressos em nmoles de fosfato inorgânico por miligrama de proteína por minuto.

3.11. Análise Bioquímica

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina (BSA) na concentração de 1mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro (PG Instruments – T60 UV-Visible Spectrophotometer) a 595nm e os resultados expressos em miligramas de proteína por mililitro de amostra.

3.12. Análise Estatística

O cálculo do número mínimo de animais (n) foi baseado na técnica da Captação do ^{14}C -MeAIB (nmol/g), no *Computer Programs for Epidemiologists* (WIN PEPI – versão 9.1), utilizando-se dados de estudo prévio (GUMÀ et al., 1992). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 95%, erro aceitável de 10% e perda esperada de 10%. Assim, chegou-se a um número amostral de 16 animais por grupo (3 grupos: Controle, Stanniocalcina 1 humana e Stanniocalcina 2 humana), 48 animais no total.

Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias e os erros padrões da média para cada um dos grupos estudados. Para a comparação entre os grupos, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, complementado com a análise Post-Hoc de Bonferroni, ambos realizados no software SPSS (IBM SPSS Statistics 19). As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$.

3.13. Proteção ao Pesquisador

Durante a execução das técnicas constantes no presente trabalho, os pesquisadores envolvidos usaram luvas de procedimento cirúrgico e aventais para sua própria proteção. Quando necessário,

também foram utilizados máscara e óculos de proteção. Além destes cuidados, a preparação das soluções ocorreu dentro da capela de exaustão. O descarte dos resíduos não-tóxicos ocorreu no sistema de esgoto comum, e os demais resíduos foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de eliminação.

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

3.14. Tratamento de Resíduos

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

4. RESULTADOS

4.1. Ações da STC1 e da STC2 sobre o fígado de *Rattus norvegicus*

4.1.1. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de ^{14}C -MeAIB

Após a incubação na presença de diferentes doses do hormônio STC1, a captação de ^{14}C -MeAIB pelo fígado diminuiu significativamente em relação ao grupo Controle nas doses de 0,1ng/mL e 10ng/mL (Fig. 7), $F(3, 45) = 4,85$, $p < 0,05$. Já as diferentes doses da STC2 não alteraram significativamente a captação do ^{14}C -MeAIB no fígado ($F(3, 45) = 2,03$, $p = 0,122$) em relação ao grupo Controle (Fig. 7). Além disso, no tecido hepático, não foi constatada diferença significativa na captação do ^{14}C -MeAIB entre os grupos incubados com a STC1 e a STC2 ($F(1,45) = 2,675$, $p = 0,109$).

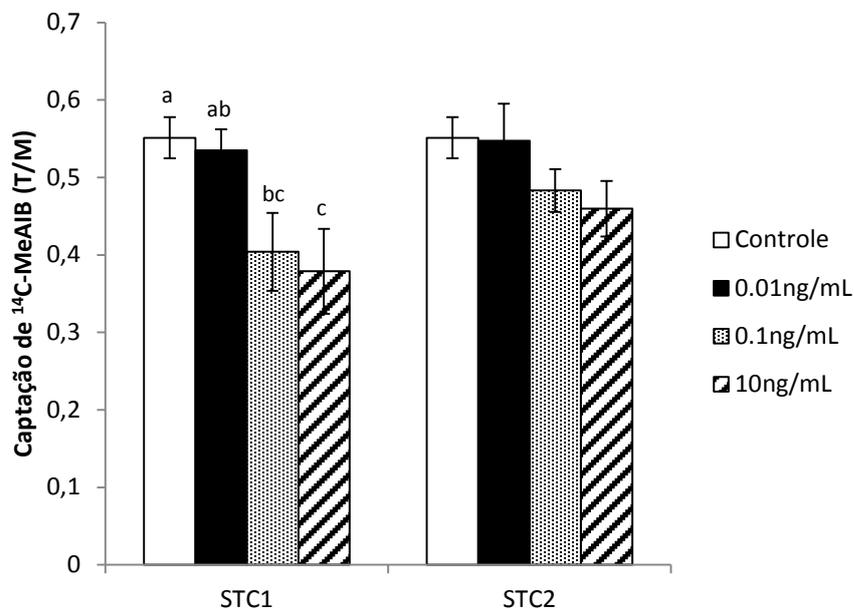


Figura 7 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a captação de ^{14}C -MeAIB no fígado de ratos. Resultados expressos na relação tecido/meio, $n=4-11$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. Dentro de cada histograma (hormônio), letras diferentes representam diferença significativa entre as doses ($p < 0,05$).

4.1.2. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de ^{14}C -AIB

Independentemente da dose de STC1 ou de STC2 utilizada durante a incubação do tecido hepático, a captação de ^{14}C -AIB não apresentou diferença significativa em relação ao grupo Controle ($F(3, 40) = 0,77, p = 0,519$ para STC1 e $F(3, 40) = 0,56, p = 0,643$ para a STC2) (Fig. 8). A captação de ^{14}C -AIB também não apresentou diferença significativa quando o tecido hepático foi incubado com STC1 em comparação com a incubação com STC2, $F(1, 40) = 0,281, p = 0,599$.

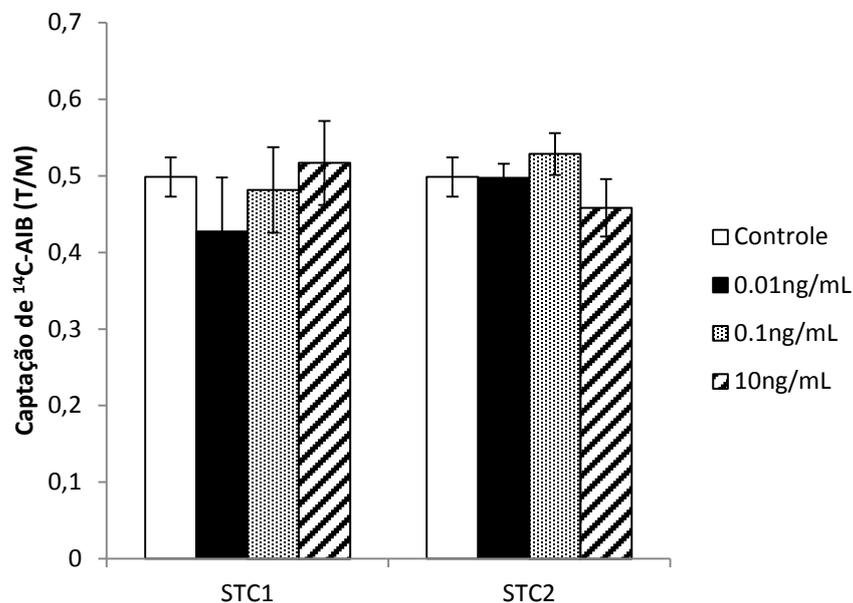


Figura 8 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a captação de ^{14}C -AIB no fígado de ratos. Resultados expressos na relação tecido/meio, $n=4-10$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média.

4.1.3. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U- ^{14}C]Alanina em $^{14}\text{CO}_2$

No fígado, a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir da oxidação do aminoácido ^{14}C -Alanina não foi afetada significativamente nem pelas diferentes doses da STC1 ($F(3, 58) = 0,86, p = 0,466$) nem pelas

diferentes doses do hormônio STC2 ($F(3, 58) = 0,72, p = 0,545$) (Fig. 9). Tampouco, neste tecido, houve diferença significativa na oxidação da ^{14}C -Alanina entre a STC1 e a STC2 quando comparadas entre si ($F(1, 58) = 0,013, p = 0,910$) (Fig. 9).

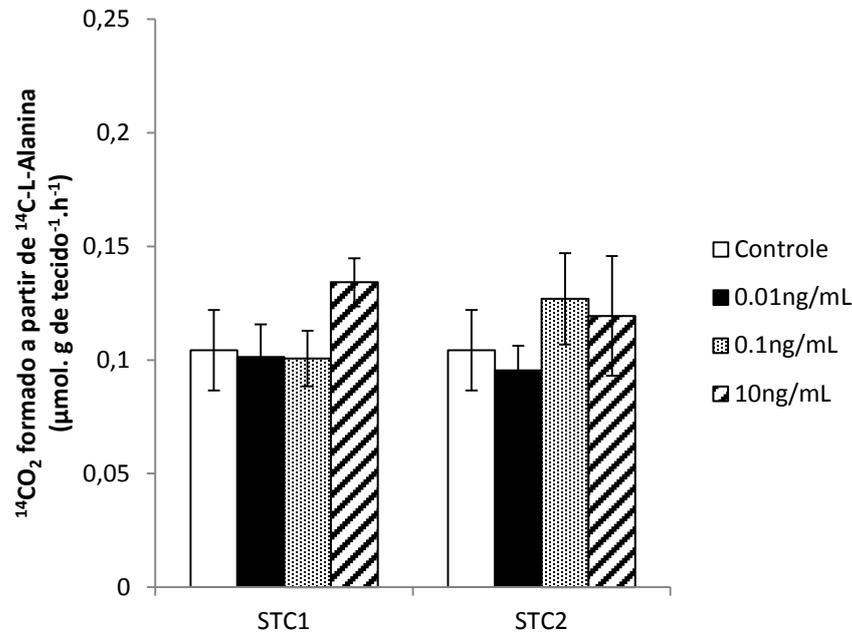


Figura 9 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a oxidação de L-[U- ^{14}C] Alanina a $^{14}\text{CO}_2$ no fígado de ratos. Resultados expressos na concentração (μmolar) de $^{14}\text{CO}_2$ formado por grama de tecido por hora de incubação, $n=8-9$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média.

4.1.4. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a atividade da enzima Malato Desidrogenase (MDH) mitocondrial

A atividade da enzima MDH mitocondrial diminuiu significativamente, em relação ao grupo Controle, quando o tecido foi incubado em presença das diferentes doses de STC1 ($F(3, 32) = 8,03, p < 0,001$) (Fig. 10); contudo, não foram constatadas diferenças significativas na atividade da MDH entre as doses de 0,01, 0,1 e 10ng/mL da STC1. O mesmo comportamento pôde ser observado nos tecidos incubados com STC2: a atividade da MDH foi significativamente menor nas doses de 0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL, quando comparada àquela verificada no grupo Controle ($F(3, 32) = 8,77, p < 0,001$) (Fig. 10).

Por fim, quando a atividade da MDH mitocondrial dos tecidos incubados com STC1 foi comparada com aquela apresentada pelos tecidos incubados com STC2, não foi possível detectar nenhuma diferença significativa entre os dois hormônios ($F(1, 32) = 0,113, p = 0,739$) (Fig.10).

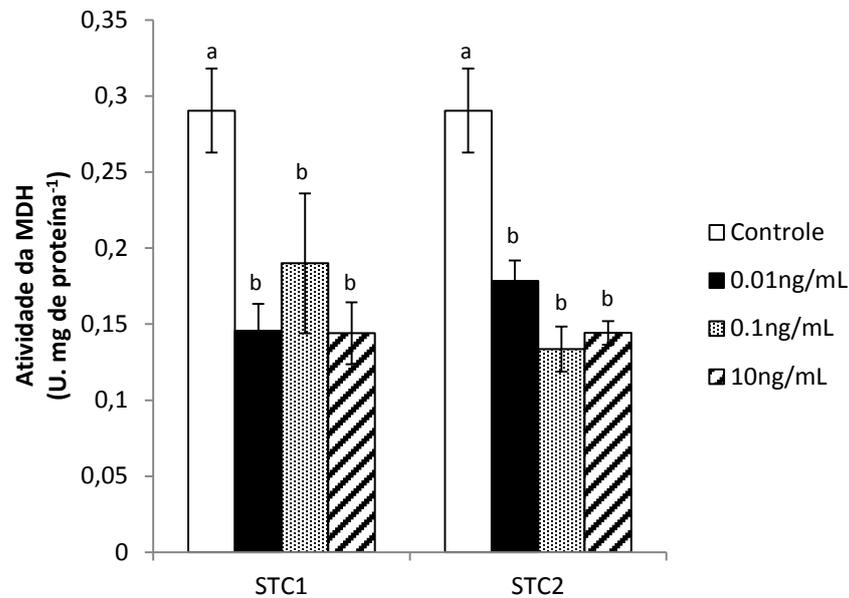


Figura 10 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a atividade enzimática da MDH no fígado de ratos. Resultados expressos em Unidades de enzima por miligrama de proteína, $n=5$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. Dentro de cada histograma (hormônio), letras diferentes representam diferença significativa entre as doses ($p<0,05$).

4.1.5. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a formação de ^{14}C -Glicose a partir de L-[U- ^{14}C]Alanina

No fígado, as diferentes doses da STC1 e da STC2 não alteraram significativamente a incorporação de ^{14}C -Alanina em ^{14}C -Glicose quando comparada àquela obtida no grupo Controle ($F(3, 62) = 0,44, p = 0,727$ e $F(3, 62) = 0,64, p = 0,595$ para a STC1 e STC2, respectivamente) (Fig. 11). No entanto, as STC1 e STC2 tiveram um efeito significativamente diferente na formação de glicose a partir de ^{14}C -Alanina ($F(1, 62) = 4,566, p < 0,05$). Especificamente, a incubação do tecido hepático com 10ng/mL de STC2 produz uma incorporação de ^{14}C -Alanina em ^{14}C -Glicose

significativamente maior do que aquela obtida no tecido incubado com a mesma dose de STC1 (Fig. 11).

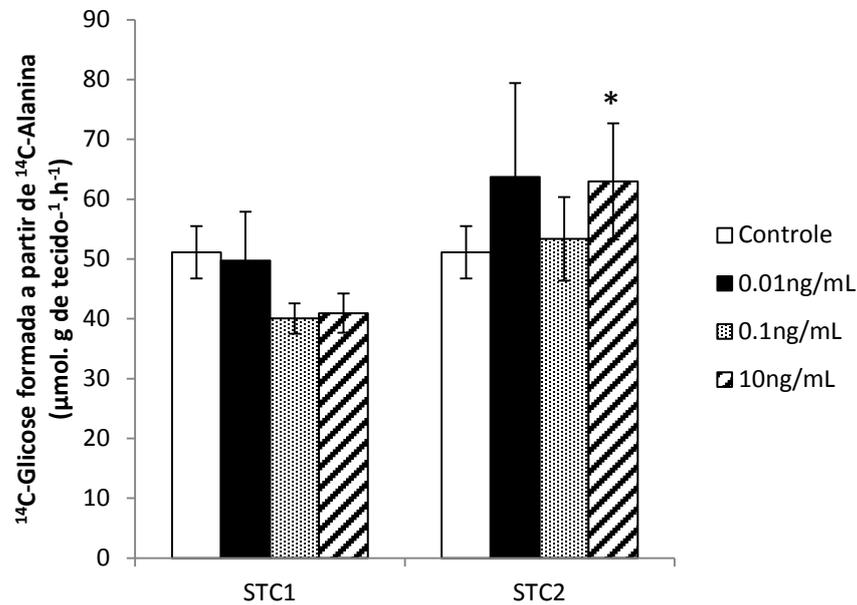


Figura 11 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a formação de ^{14}C -Glicose a partir de L-[U- ^{14}C]Alanina no fígado de ratos. Resultados expressos na concentração (μmolar) de glicose formada por grama de tecido por hora de incubação, $n=8-10$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias da STC1 em relação a STC2 dentro da dose de 10ng/mL ($p < 0,05$).

4.1.6. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação da L-[U- ^{14}C]Alanina em ^{14}C -Glicogênio

No tecido hepático, a presença de STC1 na dose de 10ng/mL aumentou em 2,6 vezes a incorporação de ^{14}C -Alanina em ^{14}C -Glicogênio, quando comparada aos valores obtidos no grupo Controle ($F(3, 25) = 5,07, p < 0,05$) (Fig. 12). Já quando este tecido foi incubado na presença de 0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL de STC2, a formação de ^{14}C -Glicogênio a partir de ^{14}C -Alanina foi de 2 a 2,4 vezes maior do que aquela verificada no grupo Controle ($F(3, 25) = 3,45, p < 0,05$) (Fig. 12). Por fim, a comparação entre os efeitos da STC1 e da STC2 sobre a síntese de ^{14}C -Glicogênio a partir de ^{14}C -Alanina não mostrou diferença significativa entre os hormônios ($F(1, 25) = 1,250, p = 0,274$) (Fig. 12).

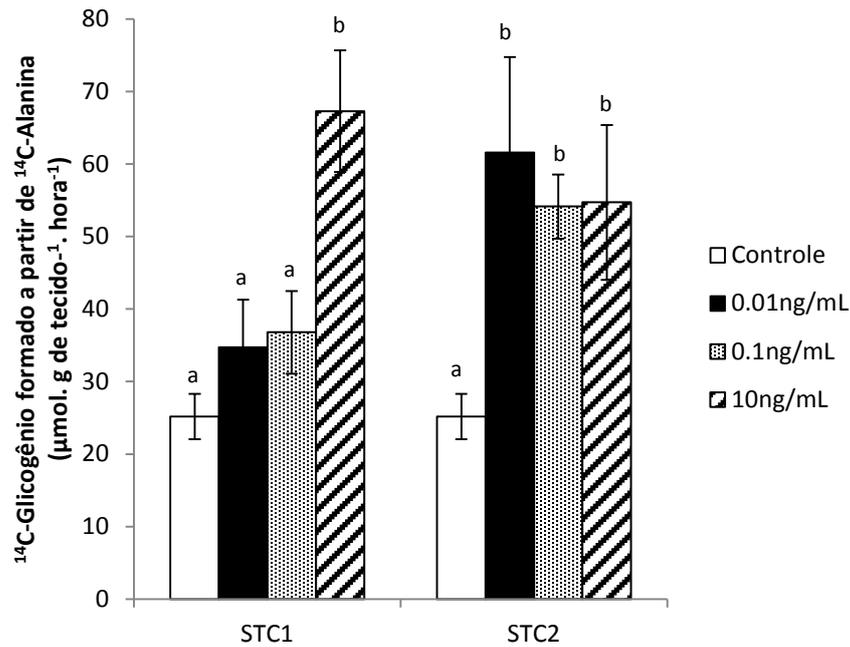


Figura 12 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a formação de glicogênio a partir de L-[U-¹⁴C]Alanina no fígado de ratos. Resultados expressos na concentração (μmolar) de glicogênio formado por grama de tecido por hora de incubação, $n=4$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. Dentro de cada histograma (hormônio), letras diferentes representam diferença significativa entre as doses ($p<0,05$).

4.1.7. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴C-Lipídios totais

A formação de ¹⁴C-Lipídios totais a partir do aminoácido ¹⁴C-Alanina não foi alterada significativamente, em relação ao grupo Controle, em presença dos hormônios STC1 ($F(3, 28) = 0,08$, $p = 0,971$) e STC2 ($F(3, 28) = 0,99$, $p = 0,410$) no tecido hepático (Fig. 13). Quando comparados os efeitos da STC1 em relação aos efeitos da STC2 na incorporação de ¹⁴C-Alanina em ¹⁴C-Lipídios totais, verifica-se que não foi constatada diferença significativa entre os resultados dos dois hormônios ($F(1, 28) = 0,295$, $p = 0,591$) (Fig. 13).

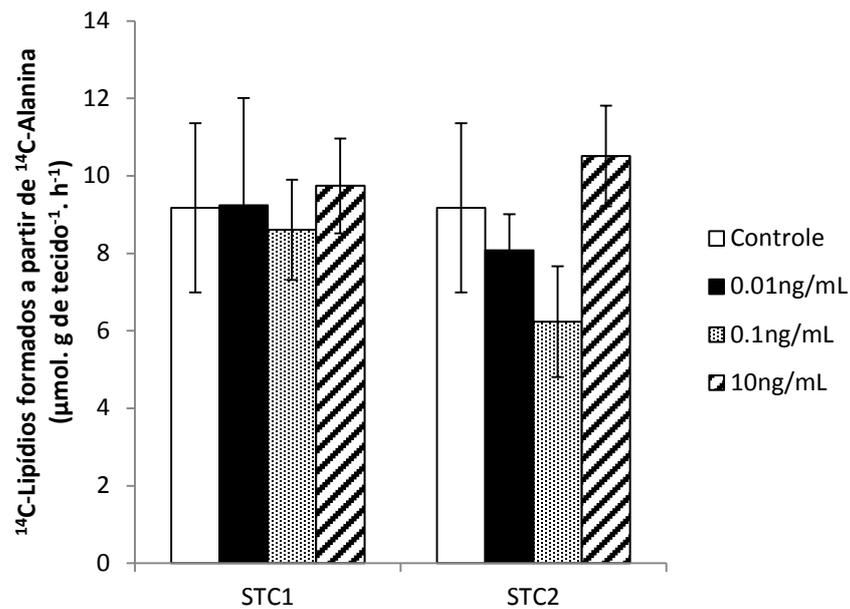


Figura 13 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a síntese de lipídios a partir de L-[U-¹⁴C]Alanina no fígado de ratos. Resultados expressos na concentração (μmolar) de lipídios formados por grama de tecido por hora de incubação, $n=4-5$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média.

4.1.8. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴C-Proteínas

No fígado, a adição das diferentes doses de STC1 ou de STC2 ao meio de incubação não alterou significativamente a síntese de proteínas a partir de L-[U-¹⁴C]Alanina em relação aos grupos Controle ($F(3, 32) = 0,09$, $p = 0,965$, para a STC1 e $F(3, 32) = 0,04$, $p = 0,989$ para a STC2) (Fig. 14). Além disso, quando comparados os resultados da incubação em presença do hormônio STC1 em relação àqueles obtidos em presença de STC2, não houve diferença significativa entre os dois grupos ($F(1, 32) = 0,262$, $p = 0,612$) (Fig. 14).

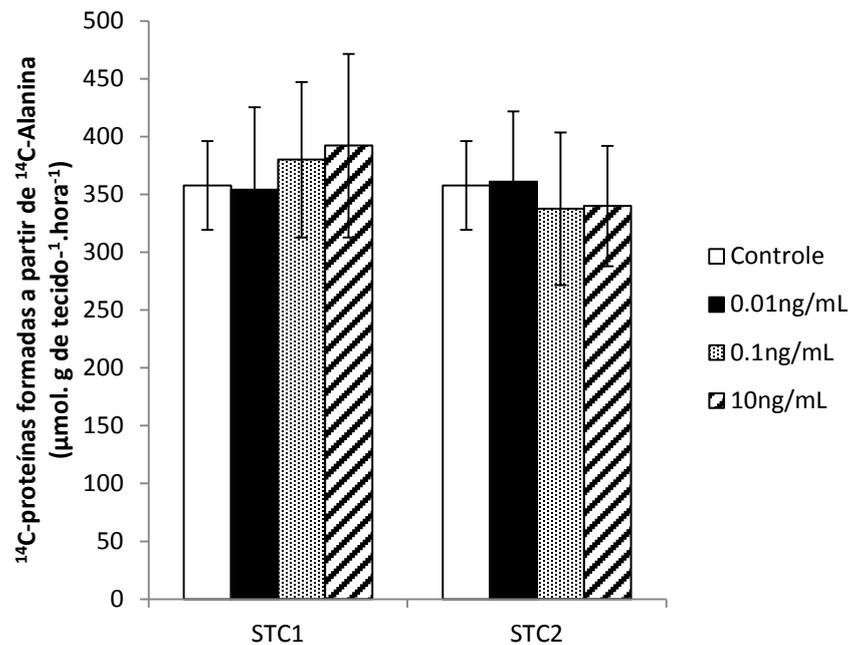


Figura 14 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a síntese de ¹⁴C-Proteínas a partir de L-[U-¹⁴C]Alanina no fígado de ratos. Resultados expressos na concentração (μmolar) de proteína formada por grama de tecido por hora de incubação, $n=5$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média.

4.1.9. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Leucina em ¹⁴C-Proteínas

A STC1, quando adicionada ao meio de incubação nas doses de 0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL, não alterou significativamente a síntese de proteínas a partir de L-[U-¹⁴C]Leucina no tecido hepático ($F(3, 63) = 2,10$, $p = 0,109$, Fig. 15). Neste mesmo tecido, as diferentes doses da STC2 causaram diferenças significativas na incorporação da ¹⁴C-Leucina em proteínas ($F(3, 63) = 4,20$, $p < 0,05$). O tecido incubado com a STC2 na dose de 0,01ng/mL teve uma síntese de proteínas aumentada em 44% em relação ao Controle; no entanto essa diferença não é significativamente diferente. Já na dose de 0,1ng/mL de STC2, houve um aumento significativamente diferente de 63% em relação ao grupo Controle. Além disso, quando comparados os efeitos da STC1 e da STC2 sobre a síntese de proteínas a partir de ¹⁴C-Leucina no fígado (Fig. 15), nenhuma diferença significativa entre os dois hormônios foi detectada ($F(1, 63) = 1,726$, $p = 0,194$).

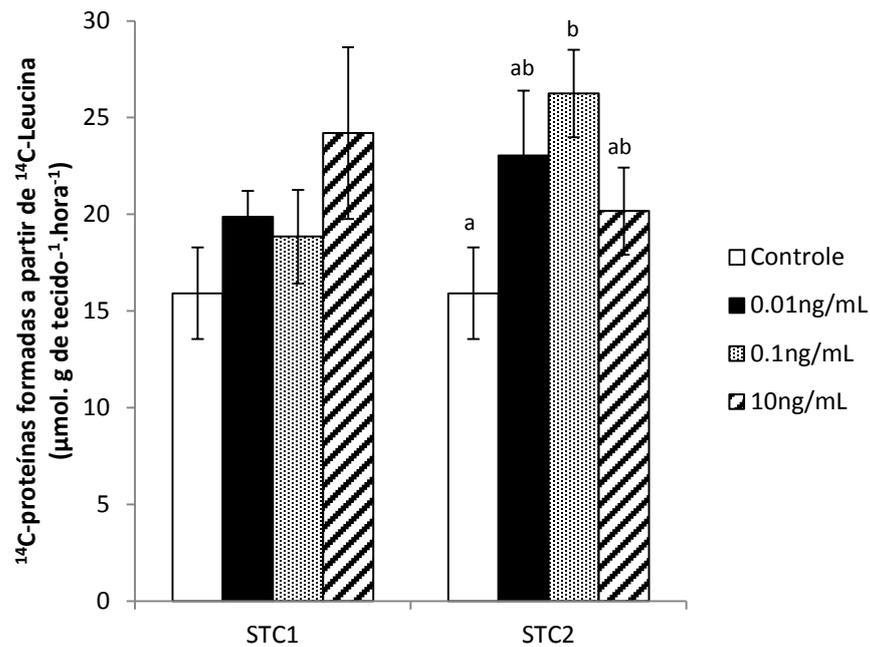


Figura 15 - Efeito de diferentes doses de STC1 e STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) na síntese de ¹⁴C-Proteínas a partir de L-[U-¹⁴C]Leucina no fígado de ratos. Resultados expressos na concentração (μmolar) de proteína formada por grama de tecido por hora de incubação, $n=8-10$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. Dentro de cada histograma (hormônio), letras diferentes representam diferença significativa entre as doses ($p < 0,05$).

4.1.10. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a atividade da Bomba Na⁺/K⁺-ATPase

No tecido hepático, apesar de as doses de 0,01ng/mL e de 0,1ng/mL de STC1 terem aumentado 37% e 50%, respectivamente, a atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase (Fig. 16), esse aumento não foi significativamente diferente do grupo Controle. Por outro lado, na dose de 10ng/mL de STC1, a atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase reduziu significativamente em comparação com as doses de 0,01 e de 0,1ng/mL ($F(3, 58) = 5,97, p < 0,05$), retornando a valores semelhantes àqueles obtidos no grupo Controle. A STC2 nas doses utilizadas não alterou significativamente a atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase (Fig. 16), $F(3, 58) = 1,36, p = 0,263$.

Além disso, comparando-se o efeito da STC1 e da STC2 sobre a atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase, constata-se que a STC1, nas doses de 0,01ng/mL e de 0,1ng/mL, aumenta significativamente a atividade da bomba quando comparada às mesmas doses de STC2 ($F(1, 58) = 7,016, p < 0,05$).

Por fim, existe uma interação significativa entre a dose do hormônio e o hormônio utilizado na atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase, $F(3, 58) = 7,306$, $p < 0,001$. Isso indica que os hormônios STC1 e STC2 são afetados diferentemente pela dose utilizada. Especificamente, a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase é semelhante durante a incubação com STC1 (média (M) = 0,0038, desvio padrão (Dp) = 0,0014) e STC2 (M = 0,0038, Dp = 0,0014) no grupo Controle, e a atividade da bomba também é semelhante com a STC1 (M = 0,0027, Dp = 0,0011) e com a STC2 (M = 0,0040, Dp = 0,0017) na dose de 10ng/mL. No entanto, a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase, quando o tecido é incubado com STC1, é significativamente maior do que aquela do tecido incubado com STC2 nas doses de 0,01ng/mL (M = 0,0053 e Dp = 0,0018 para a STC1 e M = 0,0034 e Dp = 0,0010 para a STC2) e 0,1ng/mL (M = 0,0061 e Dp = 0,0025 para a STC1 e M = 0,0025 e Dp = 0,0013 para a STC2).

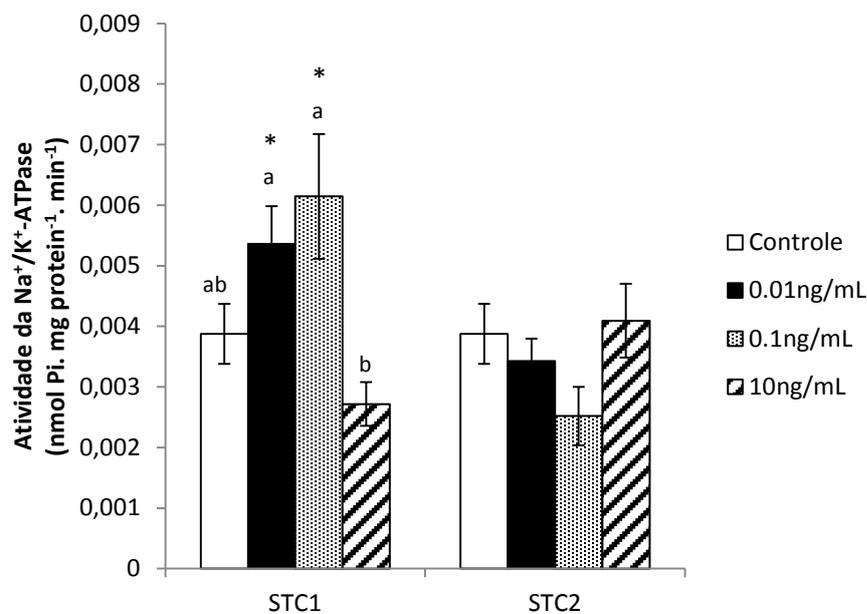


Figura 16 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase no fígado de ratos. Resultados expressos em concentração (nmolar) de fosfato (Pi) formado por miligrama de proteína por minuto de incubação, $n=6-10$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. Dentro de cada histograma (hormônio), letras diferentes representam diferença significativa entre as doses ($p < 0,05$). * representa diferença significativa entre as médias da STC1 em relação a STC2 dentro das doses de 0,01 e 0,1ng/mL ($p < 0,05$).

4.2. Ações da STC1 e da STC2 sobre o músculo gastrocnêmio de *Rattus norvegicus*

4.2.1. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de ^{14}C -MeAIB

A incubação do tecido muscular com diferentes doses tanto de STC1 quanto de STC2 não alterou significativamente a captação de ^{14}C -MeAIB em relação ao grupo Controle ($F(3, 44) = 0,30$, $p = 0,826$ e $F(3, 44) = 0,98$, $p = 0,413$ para a STC1 e STC2, respectivamente) (Fig. 17). Esses dois hormônios, quando comparados entre si, também não apresentaram diferença significativa na captação de ^{14}C -MeAIB, $F(1, 44) = 2,574$, $p = 0,116$ (Fig. 17).

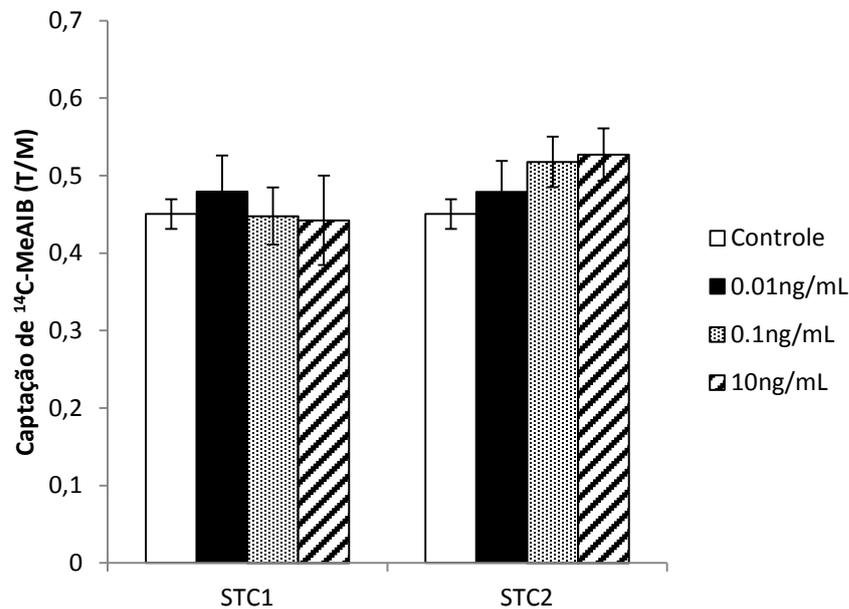


Figura 17 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a captação de ^{14}C -MeAIB no músculo gastrocnêmio de ratos. Resultados expressos na relação tecido/meio, $n=5-11$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média.

4.2.2. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a captação de ^{14}C -

AIB

O tecido muscular também não mostrou diferença significativa na captação do ^{14}C -AIB frente à incubação com diferentes doses tanto do hormônio STC1 ($F(3, 43) = 1,20, p = 0,322$) quanto do hormônio STC2 ($F(3, 43) = 1,46, p = 0,238$) (Fig. 18). No entanto, neste tecido, a captação de ^{14}C -AIB na presença da dose de 10ng/mL de STC2 é significativamente maior do que a captação de ^{14}C -AIB na presença da mesma dose de STC1 (Fig. 18), $F(1, 43) = 9,44, p < 0,05$.

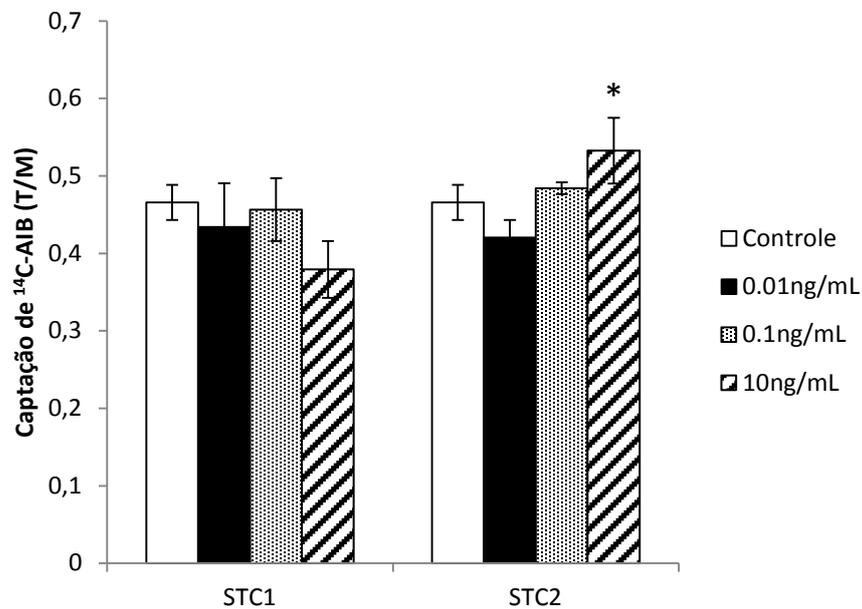


Figura 18 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a captação de ^{14}C -AIB no músculo gastrocnêmio de ratos. Resultados expressos na relação tecido/meio, $n=4-11$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias da STC1 em relação a STC2 dentro da dose de 10ng/mL ($p < 0,05$).

4.2.3. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴CO₂

Não houve, no músculo gastrocnêmio, diferença significativa na oxidação de ¹⁴C-Alanina a ¹⁴CO₂ entre as diferentes doses de STC1 ($F(3, 40) = 0,02, p = 0,995$) e de STC2 ($F(3, 40) = 0,49, p = 0,693$) e o grupo Controle (Fig. 19). Além disso, quando comparada a formação de ¹⁴CO₂ resultante da incubação com STC1 com a oxidação resultante da incubação com STC2, nenhuma diferença significativa foi observada neste tecido ($F(1, 40) = 0,20, p = 0,888$) (Fig. 19).

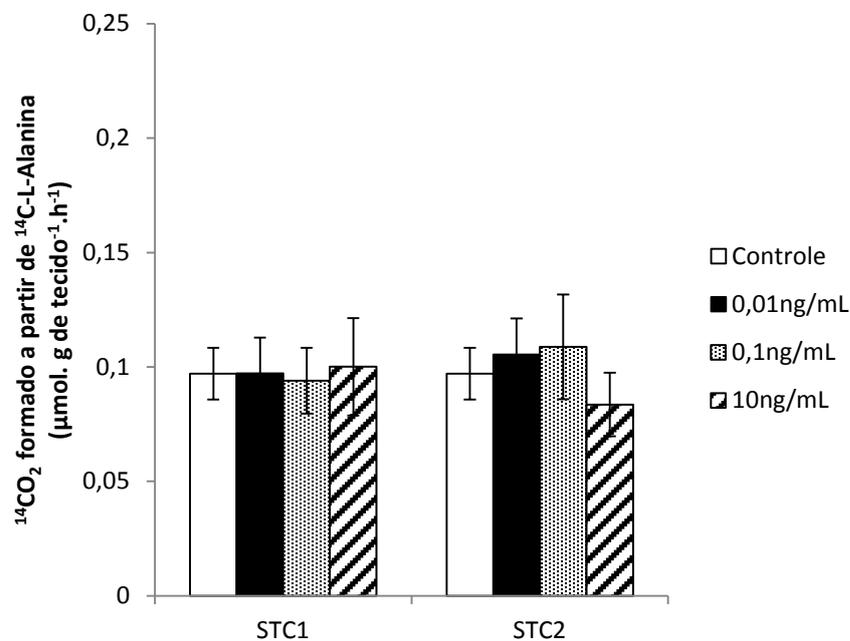


Figura 19 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a oxidação de L-[U-¹⁴C]Alanina a ¹⁴CO₂ no músculo gastrocnêmio de ratos. Resultados expressos na concentração (µmolar) de ¹⁴CO₂ formado por grama de tecido por hora de incubação, $n=6$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média.

4.2.4. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Leucina em ¹⁴CO₂

As diferentes doses da STC1 não alteram significativamente a oxidação de ¹⁴C-Leucina no músculo gastrocnêmio em relação ao grupo Controle ($F(3, 37) = 1,10, p = 0,361$). Já a incubação com as diferentes doses de STC2 apresenta efeito significativo ($F(3, 37) = 4,27, p < 0,05$) na geração de ¹⁴CO₂ (Fig. 20). Em relação ao grupo Controle, a oxidação de ¹⁴C-Leucina no músculo foi estimulada significativamente quando o tecido foi incubado em presença de todas as doses (0,01, 0,1 e 10ng/mL) de STC2 (todos os $ps < 0,05$).

Além disso, a formação de ¹⁴CO₂ a partir da oxidação da ¹⁴C-Leucina no músculo gastrocnêmio é significativamente maior quando o tecido é incubado com STC2 nas concentrações de 0,01ng/mL e de 0,1ng/mL ($F(1, 37) = 7,45, p < 0,05$ e $F(1, 37) = 5,85, p < 0,05$, respectivamente) em relação ao tecido incubado com essas mesmas doses de STC1 (Fig. 20).

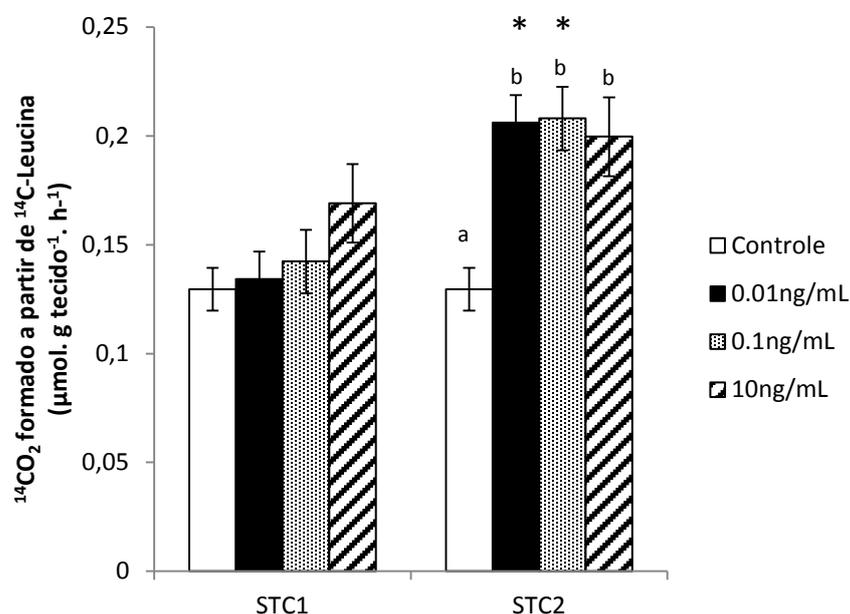


Figura 20 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a oxidação de L-[U-¹⁴C]Leucina a ¹⁴CO₂ no músculo gastrocnêmio de ratos. Resultados expressos na concentração (μmolar) de ¹⁴CO₂ formado por grama de tecido por hora de incubação, $n=4-7$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. Dentro de cada histograma (hormônio), letras diferentes representam diferença significativa entre as doses ($p < 0,05$). * representa diferença significativa entre as médias da STC1 em relação a STC2 dentro das doses de 0,01 e 0,1ng/mL ($p < 0,05$).

4.2.5. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Alanina em ¹⁴C-Proteínas

No músculo gastrocnêmio, tanto as diferentes doses de STC1 quanto as de STC2 não alteraram significativamente, em relação ao grupo Controle, a incorporação de ¹⁴C-Alanina em ¹⁴C-Proteínas ($F(3, 32) = 1,44, p = 0,251$ para a STC1 e $F(3, 32) = 0,48, p = 0,698$ para a STC2) (Fig. 21). No entanto, comparando-se a ação da STC1 com a da STC2, verifica-se que, na dose de 10ng/mL, a STC1 provoca uma síntese de proteínas a partir da ¹⁴C-Alanina significativamente maior do que aquela observada durante a incubação com a mesma dose de STC2 (Fig. 21).

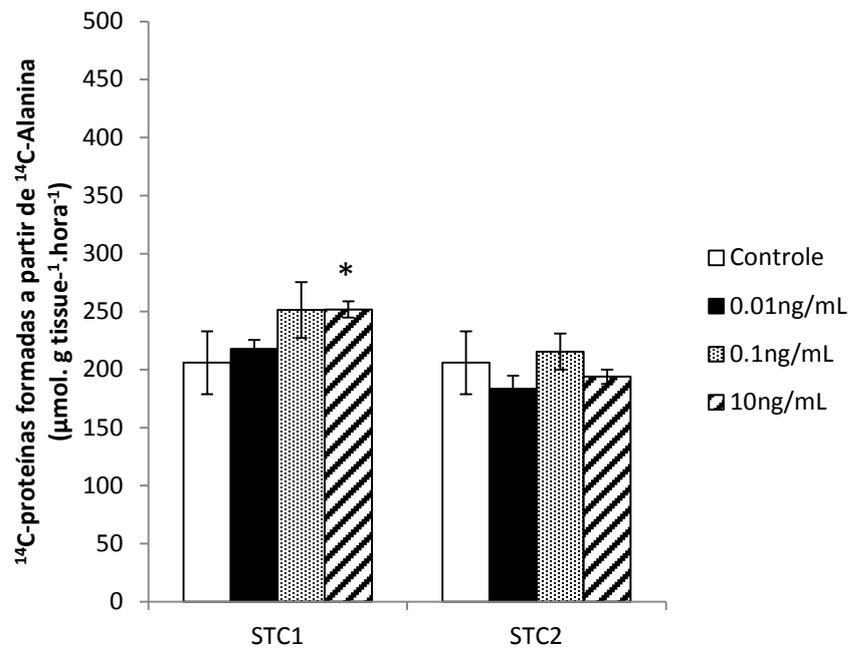


Figura 21 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a síntese de ¹⁴C-Proteínas a partir de L-[U-¹⁴C]Alanina no músculo gastrocnêmio de ratos. Resultados expressos na concentração (µmolar) de proteína formada por grama de tecido por hora de incubação, $n=5$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. * representa diferença significativa entre as médias da STC1 em relação a STC2 dentro da dose de 10ng/mL ($p<0,05$).

4.2.6. Estudo *in vitro* da ação de diferentes doses de STC1 e de STC2 sobre a incorporação de L-[U-¹⁴C]Leucina em ¹⁴C-Proteínas

O tecido muscular incubado em presença das diferentes doses do hormônio STC1 não apresentou variação significativa na síntese de proteínas a partir de L-[U-¹⁴C]Leucina em relação ao grupo Controle ($F(3, 65) = 1,55, p = 0,209$) (Fig. 22). Por outro lado, quando diferentes concentrações de STC2 foram adicionadas ao meio de incubação, ocorreu um aumento na incorporação da ¹⁴C-Leucina em ¹⁴C-Proteínas ($F(3, 63) = 2,74, p < 0,05$) com a dose de 0,1ng/mL, quando comparado aos valores obtidos no grupo Controle (Fig. 22).

Por fim, no tecido muscular, não ocorreu uma variação significativa na incorporação de ¹⁴C-Leucina em ¹⁴C-Proteínas entre as amostras incubadas com STC1 e aquelas incubadas com STC2 (Fig. 22), $F(1, 63) = 1,723, p = 0,194$.

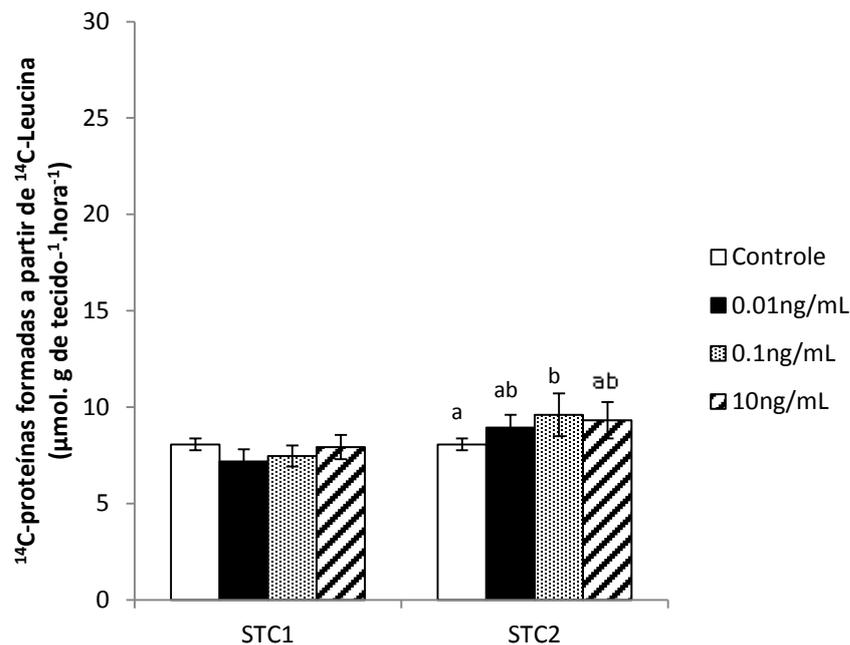


Figura 22 - Efeito de diferentes doses de STC1 e de STC2 (0,01ng/mL, 0,1ng/mL e 10ng/mL) sobre a síntese de ¹⁴C-Proteínas a partir de L-[U-¹⁴C]Leucina no músculo gastrocnêmio de ratos. Resultados expressos na concentração (μmolar) de proteína formada por grama de tecido por hora de incubação, $n=8-10$ animais. As colunas e barras representam, respectivamente, as médias e erro padrão da média. Dentro de cada histograma (hormônio), letras diferentes representam diferença significativa entre as doses ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A presença dos hormônios STC1 e STC2 em mamíferos é uma descoberta muito recente. Os estudos iniciais com esses hormônios limitaram-se a investigar o papel das STCs no controle dos níveis de cálcio e fosfato celulares, ações que já eram reconhecidas em peixes. No entanto, uma expansão considerável no conhecimento das funções desses hormônios já foi feita, incluindo ações no desenvolvimento, na reprodução e como marcador molecular de certos tipos tumorais. Nos últimos anos, alguns estudos apontaram para uma possível ação dos hormônios STC1 e STC2 sobre o metabolismo intermediário de mamíferos. Dentro dessa perspectiva, foram muito importantes os achados sobre a localização de receptores para esses hormônios na membrana mitocondrial (MCCUDDEN et al., 2002) e a ação da STC1 como desacopladora da respiração celular (ELLARD et al., 2007). Devido à novidade do tema e, conseqüentemente, a ausência de estudos pontuais sobre os efeitos metabólicos das STC1 e STC2 sobre o metabolismo intermediário, a discussão deste trabalho apresenta poucas referências comparativas.

5.1. Ações da STC1 e da STC2 sobre o fígado de *Rattus norvegicus*

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, o papel, *in vitro*, da STC1 e da STC2 como hormônios reguladores do metabolismo de aminoácidos no fígado de ratos.

Os transportadores de aminoácidos na membrana das células não podem ser vistos como simples sistemas translocadores, mas sim como um importante local de controle da função celular. Esses transportadores, especialmente aqueles conduzidos pelo gradiente eletroquímico do sódio (Na^+), constroem gradientes de concentração intra e extracelular para os aminoácidos. Assim, a atividade e os níveis de mRNA do transportador ou a disponibilidade de energia celular determinam a concentração intracelular dos aminoácidos e mudanças nesse parâmetro podem controlar a atividade metabólica celular (KILBERG & HÄUSSINGER, 1992).

O fígado é um órgão reconhecido por possuir um importante papel no controle dos níveis de aminoácidos livres no plasma via importação e exportação de aminoácidos para dentro ou para fora do hepatócito (KILBERG & HÄUSSINGER, 1992). No presente trabalho, a STC1, nas doses de 0,1ng/mL e 10ng/mL, diminuiu a captação do ácido 2-(metilamino)isobutírico (MeAIB) no fígado, enquanto a STC2 não apresentou efeitos sobre esse parâmetro. O MeAIB é um análogo específico

não-metabolizável do transporte via sistema A, ou seja, ele é transportado pelo mesmo mecanismo que os aminoácidos dependentes do sistema A, porém não é metabolizado pela célula (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992).

O sistema A de transporte de aminoácidos é regulado por um amplo espectro de classes hormonais (KILBERG & HÄUSSINGER, 1992; SHOTWELL et al., 1983). Em geral, os hormônios alteram a $V_{m\acute{a}x}$ do sistema de transporte e não o K_m para o aminoácido (SHOTWELL et al., 1983). Um acréscimo na $V_{m\acute{a}x}$ do sistema de transporte é geralmente resultado de um aumento no número de transportadores ativos inseridos na membrana plasmática. Se esse aumento é causado pela ativação de carreadores já presentes na membrana ou se é gerado pela síntese de novos carreadores precisa ser investigado com estudos de biologia molecular.

Variações na captação de aminoácidos pelo hepatócito têm como consequência a geração de um gradiente osmótico nessas células, o que resulta em alterações no volume celular. Essas mudanças no volume celular são reconhecidas como importantes moduladoras da função celular hepática (HÄUSSINGER et al., 1990). Alguns trabalhos sugerem que a STC1 diminui a concentração intracelular de cálcio em diferentes tipos celulares, como por exemplo, o trabalho de Sheikh-Hamad et al. (2003) que demonstrou, em culturas de cardiomiócitos, que a STC1 cessa a contração por inibição das correntes de Ca^{2+} através dos canais do tipo L. Esses dados indicam que a STC1 pode ter funções osmóticas em mamíferos. Portanto, se, durante o presente experimento, a STC1 agiu na diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular, a consequente diminuição do volume celular poderia ter causado o decréscimo na captação do MeAIB observado. No entanto, a hipótese de que a redução da concentração intracelular de cálcio diminuiria o transporte de MeAIB é contestada pela comprovação de que o transporte via sistema A não sofre alteração em presença ou ausência de cálcio (KEMPSON et al., 2006).

A captação de aminoácidos pelo sistema A é dirigida pelo gradiente eletroquímico do sódio e a manutenção desse gradiente é promovida, basicamente, pela bomba Na^+/K^+ -ATPase. Os resultados mostraram que a STC1 aumentou a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase em 37% e 50% para a dose de 0,01ng/mL e 0,1ng/mL, respectivamente, mesmo que esse aumento não tenha sido estatisticamente significativo. No entanto, apesar da atividade do sistema A ser dirigida pelo gradiente de Na^+ , no presente trabalho, constata-se uma redução na captação de MeAIB no fígado. Como já mencionado, sabe-se que os hormônios que aumentam ou diminuem os sistemas de captação de aminoácidos alteram a $V_{m\acute{a}x}$ do sistema de transporte (SHOTWELL et al., 1983) e que essa alteração na $V_{m\acute{a}x}$ é geralmente resultado de um aumento ou uma diminuição na concentração de transportadores ativos inseridos na membrana plasmática. Assim, sugere-se que a diminuição da captação de MeAIB no fígado causada pela STC1 vista no presente trabalho, se deva a uma ação desse hormônio sobre a diminuição na concentração de transportadores inseridos na membrana. Consequentemente, os

resultados sugerem que o sistema A de transporte de aminoácidos no fígado estaria sob o controle da STC1.

Por outro lado, os resultados do presente trabalho mostraram que, no tecido hepático, a captação do análogo ácido 2-aminoisobutírico (AIB) não foi afetada pela STC1, tampouco pela STC2, nas doses utilizadas neste estudo. Segundo Shotwell (1981), o AIB é transportado para o meio intracelular pelos sistemas A e ASC, que são dependentes de sódio, e pelo sistema L, que é realizado via difusão facilitada. O sistema L é pouco sensível à insulina e a uma variedade de outros hormônios (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992). O sistema ASC também é pouco modulado por hormônios; entretanto, o sistema A é modulado por diversos hormônios (KILBERG & HÄUSSINGER, 1992). Portanto, considerando que o ¹⁴C-AIB pode ser captado pelo hepatócito por qualquer um desses três sistemas de transporte (A, ASC e L), mas que, no presente trabalho, a captação não foi afetada pela incubação com as STCs, enquanto que a captação do MeAIB, transportado com exclusividade pelo sistema A, o foi, pode-se postular que, provavelmente, a entrada do AIB nas células hepáticas ocorreu através dos sistemas ASC ou L, e que a STC1 agiria somente sobre o sistema A de transporte de aminoácidos. Entretanto, experimentos *in vitro* utilizando meio de incubação assódico ou com ouabaína serão necessários para comprovar esta hipótese.

Os hepatócitos são importantes locais de metabolismo e de catabolismo de aminoácidos. Essas células captam aminoácidos livres, especialmente alanina, α -cetoácidos e um pouco de glutamina do meio extracelular. No entanto, uma porcentagem muito pequena do carbono do aminoácido é convertida em acetil-CoA ou corpos cetônicos, e é oxidada via ciclo do ácido tricarboxílico (CAT). A maior parte da energia obtida da oxidação dos aminoácidos captados pelo fígado é derivada da oxidação da glicose formada, via gliconeogênese, a partir dos esqueletos de carbono desses aminoácidos (SMITH et al., 2007). Prova disso é que os aminoácidos de cadeia ramificada, grupo composto pela valina, pela isoleucina e pela leucina, que não são utilizados como substratos para a gliconeogênese, são oxidados principalmente no músculo esquelético e em alguns outros tecidos, mas nunca no fígado.

A oxidação de aminoácidos, assim como a da glicose e de lipídios, ocorre na mitocôndria celular. Estudos demonstraram a ligação do hormônio STC1 na membrana plasmática e na membrana mitocondrial de hepatócitos, sendo que 90% do hormônio foram localizados na matriz mitocondrial destas células (MCCUDDEN et al., 2002). Esses achados sustentam a importância deste hormônio no controle do metabolismo mitocondrial, sendo que é a primeira vez que receptores de hormônios peptídicos são verificados na membrana dessa organela celular (MCCUDDEN et al., 2002). Por fim, esses autores também demonstraram que a STC2 não foi capaz de diminuir a capacidade de ligação da STC1 às membranas mitocondriais isoladas, sugerindo que as ações desse hormônio se deem a partir da atuação sobre um tipo diferente de receptor.

No entanto, no presente trabalho, as doses da STC1 ou de STC2 utilizadas não foram capazes de modificar a oxidação de alanina no fígado. Esse resultado pode ser explicado, em parte, pela redução de 31% da captação de aminoácidos via sistema A, o qual é utilizado pela alanina, em presença de STC1. Contudo, este achado é reforçado pela redução na atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) mitocondrial no tecido hepático em presença de STC1 e STC2. A malato desidrogenase é uma enzima envolvida em vários processos celulares. As células eucarióticas contêm duas MDHs dependentes de NAD: uma mitocondrial e uma citoplasmática. A MDH citoplasmática é responsável pela lançadeira malato-oxaloacetato através da membrana mitocondrial. Já a MDH mitocondrial está envolvida no CAT, catalisando a inter-conversão de L-malato a oxaloacetato ligada à oxidação/redução das coenzimas NAD^+ e NADH (LUO et al., 2006). Durante o CAT, o oxaloacetato formado a partir da reação da malato desidrogenase é continuamente removido pela sua condensação com o acetil-CoA, gerando citrato (1ª etapa do ciclo). Isto mantém a concentração celular de oxaloacetato extremamente baixa, deslocando a reação da malato desidrogenase no sentido da formação de oxaloacetato (NELSON & COX, 2011).

Gonçalves (2012), estudando *in vitro* a ação dos hormônios STC1 e STC2 sobre o metabolismo de carboidratos, verificou diminuição da capacidade de oxidação da ^{14}C -Glicose no fígado de ratos sem alteração da atividade da enzima piruvato cinase, sugerindo que, além de atuar sobre a fosforilação oxidativa, as STCs poderiam ter um papel na regulação do CAT, mas não da glicólise. Esses resultados, somados à diminuição da atividade da MDH pela ação das STC1 e 2 encontrada no fígado, reforçam o papel das STCs sobre o metabolismo mitocondrial e em especial sobre a atividade do ciclo do ácido tricarboxílico e corroboram os resultados encontrados por Ellard e colaboradores (2007), que sugerem uma produção menos eficiente de ATP na presença da STC1. Em fígados de ratos incubados em presença de STC1, Gonçalves (2012) verificou aumento da relação ADP/ATP, sugerindo que a STC1 reduziria a síntese de ATP ou aumentaria sua hidrólise. Diversos autores, trabalhando com diferentes tipos celulares, verificaram que a STC1 causa desacoplamento da cadeia respiratória, levando, assim, a uma redução na síntese de ATP pela fosforilação oxidativa, mas com o benefício de redução na geração de superóxido (SHEIKH-HAMAD, 2010). No presente trabalho, os resultados sugerem que a redução da atividade da MDH mitocondrial por ação das STCs também contribuiria para a diminuição da síntese de ATP pela fosforilação oxidativa.

O fato de a alanina ser altamente disponível e facilmente captada pelo fígado sugere a importância desse aminoácido como um precursor-chave da formação de glicose a partir de aminoácidos. No entanto, no estudo aqui apresentado, a formação de glicose hepática a partir de ^{14}C -Alanina não sofreu alterações em presença da STC1 e da STC2 no meio de incubação. Recentemente, em nosso laboratório, foi verificado que a STC1 reduz marcadamente a capacidade de incorporação de ^{14}C -Glutamina em ^{14}C -Glicose na faixa externa da medula renal de ratos, pois participa da regulação do metabolismo da glutamina no rim e, conseqüentemente, da regulação do equilíbrio ácido básico

(dados submetidos à publicação). No entanto, no mesmo tecido renal, a síntese de glicose a partir de ^{14}C -Lactato não foi alterada quando o tecido era incubado em presença de STC1.

Sabidamente o fígado não possui carreador mitocondrial para o oxalacetato formado a partir da alanina pelo CAT, assim, esse deverá ser transportado através da membrana mitocondrial como malato ou aspartato. Contudo, as STCs reduziram a atividade da enzima MDH mitocondrial, diminuindo, desta forma, a formação de malato a partir de oxalacetato. Portanto, a via alternativa seria a transformação do oxalacetato formado em aspartato. O aspartato transportado para o citosol, por ação da aspartato aminotransferase, daria origem novamente a oxalacetato que, por sua vez, entraria na via gliconeogênica hepática, mantendo a atividade basal desta via de síntese de glicose.

No presente trabalho, a síntese de glicogênio no fígado, a partir do aminoácido alanina, foi estimulada pela STC1 na dose de 10ng/mL, a mais alta utilizada. A síntese de glicogênio também foi estimulada pela STC2; no entanto o efeito desse hormônio sobre a glicogênese hepática se deu desde a dose mais baixa (0,01ng/mL), e se manteve nas doses mais elevadas (0,1 e 10ng/mL). Os ratos deste estudo foram alimentados até o momento do experimento. Assim, a ^{14}C -Glicose produzida a partir de ^{14}C -Alanina pela atividade basal da via gliconeogênica foi incorporada em glicogênio hepático via neoglicogeniogênese. Evidências sugerem que a neoglicogeniogênese é quantitativamente importante no armazenamento de glicogênio no fígado após a refeição. A capacidade de síntese de glicogênio a partir de alanina em preparações de fígado, *in vitro*, é mais alta do que aquela obtida com glicose (BOYD et al., 1981). Estes achados indicam que a STC1 e, sobretudo, a STC2 estimularia a síntese de glicogênio hepático via neoglicogeniogênese quando o precursor é a alanina. Gonçalves (2012) não constatou aumento significativo na síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -Glicose em fatias de fígado de ratos incubadas em presença de STC1 ou STC2, corroborando a hipótese que estes hormônios estimulariam a via neoglicogeniogênica. Todavia, há a possibilidade de esse aumento na síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -Alanina ser devido à capacidade sintética intrínseca do tecido hepático de um animal alimentado com dieta balanceada. Estudos mais aprofundados sobre a ação das STCs sobre a síntese de glicogênio a partir de aminoácidos, como por exemplo, a determinação da glicose-6-fosfato e a relação das enzimas glicogênio sintase/fosforilase, serão necessários para melhor avaliar o papel destes hormônios sobre a síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -Alanina.

Além de participarem das reservas energéticas celulares como glicogênio, os esqueletos carbônicos resultantes da transaminação dos aminoácidos no fígado também podem ser usados para a síntese *de novo* de ácidos graxos e triacilgliceróis. Esta conversão é particularmente importante em indivíduos ou animais alimentados com dietas com baixo teor de gordura ou com alta concentração de proteínas. Os animais utilizados neste estudo foram alimentados com uma dieta balanceada até o momento dos experimentos, que tiveram início no começo da manhã. Assim, podemos considerá-los ratos alimentados. No presente trabalho, tanto a STC1 quanto a STC2 não alteraram de forma significativa a síntese de lipídios totais a partir de ^{14}C -Alanina no fígado dos ratos. Ao contrário,

quando o precursor utilizado foi a ^{14}C -Glicose, Gonçalves (2012) constatou em presença da STC1 um aumento de 50% na síntese de lipídios totais no fígado de ratos alimentados. A participação da STC1 no controle de metabolismo de lipídios foi sugerida por Paciga e colaboradores (2003) que identificaram nas células lúteas ovarianas, especializadas na esteroidogênese, a presença de STC1 especialmente na superfície das gotas lipídicas. Essas gotas são envolvidas por uma camada única de fosfolipídeos, cuja composição é bastante diferente da membrana plasmática, e possuem diversas proteínas como a perilipina, cuja função é controlar a esteroidogênese e/ou o metabolismo de lipídeos, pois sofre a ação da lipase hormônio sensível. Portanto, os experimentos *in vitro* sugerem que as STCs agem sobre a lipogênese hepática somente quando o substrato é a ^{14}C -Glicose. Já quando o substrato fornecido ao tecido hepático é a ^{14}C -Alanina, a ^{14}C -Glicose gerada pela via gliconeogênica seria, por ação das STCs, incorporada em glicogênio no fígado.

O suprimento de aminoácidos a que o fígado está sujeito influencia de forma importante a síntese de proteínas nesse órgão (MCNURLAN et al., 1979). Muitos trabalhos foram feitos com o intuito de demonstrar a ação de hormônios sobre a síntese de proteínas no fígado, e o enfoque principal sempre foi dado para as ações da insulina, que é a principal estimuladora desse processo. Os estudos sobre os efeitos da insulina na síntese de proteínas no fígado geraram, por muitos anos, dados controversos. Vários estudos usando a incorporação de radioisótopos de aminoácidos de cadeia lateral ramificada, que são pobremente metabolizados pelo fígado, mostraram que a insulina não possui efeito significativo na incorporação desses aminoácidos em proteínas hepáticas (MORTIMORE & MONDON, 1970; PAIN & GARLICK, 1974). Por isso, por muitos anos se acreditou que o efeito principal da insulina na síntese de proteínas se dava no músculo, e, no fígado, esse hormônio somente reduzia um pouco a proteólise. No entanto, estudos subsequentes que usaram vários aminoácidos metabolizáveis e outros intermediários mostraram que a insulina pode estimular a incorporação destes substratos em proteínas em até 30% (MOHAN & BESSMAN, 1986).

Esse fato levou ao conhecimento de que os aminoácidos podem ser incorporados em proteínas tanto diretamente como a molécula original quanto podem atravessar o ciclo do ácido tricarbóxico (CAT), e, então, os carbonos dos aminoácidos podem ser incorporados em proteínas via reações de transaminação mitocondriais (MOHAN et al., 1991). A partir daí foi mostrado que a insulina estimula a incorporação em proteínas principalmente daqueles carbonos que são prontamente metabolizáveis através do ciclo CAT. A alanina, por exemplo, pode ser incorporada em proteínas ou como a molécula original de alanina ou, através de sua transaminação a piruvato, esse aminoácido pode perder seu carbono 1 na reação da piruvato desidrogenase, e os carbonos 2 e 3 atravessam o CAT e são incorporados em proteínas após a transaminação a glutamato ou aspartato. O trabalho de Mohan e colaboradores (1991) mostra que a insulina aumenta significativamente a incorporação de alanina em proteínas no hepatócito.

Os resultados do presente trabalho mostram que, no fígado, os hormônios STC1 e STC2 não alteraram significativamente a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -Alanina. Este resultado pode ser explicado, em parte, pelo fato de que a ação hormonal sobre a síntese de proteínas hepáticas, como por exemplo a ação da insulina, requer que o aminoácido primeiro passe pelo ciclo do ácido tricarbóxico (MOHAN et al., 1991). Portanto, como neste trabalho as STCs não alteraram a oxidação do aminoácido ^{14}C -Alanina no fígado, e diminuíram a atividade da MDH mitocondrial, uma alteração no conteúdo de ^{14}C -Proteínas não foi encontrada. Outra hipótese para explicar esse resultado seria a ocorrência de um desvio da ^{14}C -Alanina da síntese de proteínas para a síntese de glicogênio no fígado, já que a neoglicogeniogênese aumentou marcadamente em presença das STC1 e STC2. No entanto, a síntese de proteínas no tecido hepático a partir do aminoácido leucina foi estimulada quando o tecido foi incubado com a dose de 0,1ng/mL de STC2. A leucina é um aminoácido com cadeia lateral ramificada e, portanto, não é oxidado no fígado. Esse resultado demonstra que a STC2 aumenta a síntese de proteínas quando não há necessidade de oxidação do aminoácido, como é o caso da leucina. Não há, na literatura, dados que relacionem a ação das STCs à síntese de proteínas, mas os resultados deste estudo permitem especular que tanto a STC1 quanto a STC2 possam apresentar um papel no anabolismo, estimulando a síntese de substratos energéticos.

Por fim, apesar de não explicar as alterações do transporte de aminoácidos constatada neste trabalho, a ação das STCs sobre a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase no tecido hepático é indiscutível. Os resultados mostram que o hormônio STC1 nas doses de 0,01 e 0,1ng/mL aumentou em 37% e 50% a atividade da bomba; no entanto, estes valores não foram significativamente diferentes daqueles do grupo Controle. A função básica da Na^+/K^+ -ATPase é a manutenção de elevados gradientes opostos de concentração de Na^+ e de K^+ através da membrana plasmática das células. Em particular, a bomba Na^+/K^+ -ATPase é a maior contribuinte ao estabelecimento das baixas concentrações de sódio e elevadas concentrações de potássio citoplasmáticas. Além disso, apresenta grande importância na regulação do volume celular, do pH citoplasmático e da concentração de Ca^{2+} através de trocadores como o $\text{Na}^+/\text{H}^+(\text{NH}_4^+)$ e $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, respectivamente, e, ainda, contribui secundariamente para o transporte de várias moléculas nutritivas como os aminoácidos livres e a glicose (THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

No presente trabalho as ações da STC1 e da STC2 sobre a síntese de glicogênio e de proteínas no fígado foram demonstradas. Sabe-se que os processos de síntese aumentam o volume celular (HÄUSSINGER et al., 2004; LANG et al., 1998). Assim, o aumento da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase constatado no fígado teria como função a regulação do volume celular em resposta aos processos de síntese estimulados pela STCs. Existem evidências de que hormônios como a insulina e o glucagon exercem seus efeitos metabólicos, em parte, pela modulação do volume das células hepáticas (HÄUSSINGER et al., 1990). Recentemente, foi demonstrado um aumento da expressão do gene da

STC1 no rim de ratos submetidos à privação de água por 12 a 72h, sugerindo um papel deste hormônio no balanço de água e de sais nas células renais (TURNER et al., 2010).

5.2. Ações da STC1 e da STC2 sobre o músculo gastrocnêmio de *Rattus norvegicus*

O tecido muscular possui diversas atividades metabólicas, como a oxidação de aminoácidos e o suprimento de substratos para a gliconeogênese. Essas ações somente podem ser conduzidas porque o músculo possui a capacidade de captar os aminoácidos provenientes de todos os tecidos do corpo (MACKENZIE et al., 1992). Ao contrário do que ocorreu no fígado, as STCs não afetaram a captação dos análogos MeAIB e AIB no músculo gastrocnêmio. Em mamíferos, o músculo esquelético é a maior parte de massa magra do corpo, e contém a maior reserva de proteínas do corpo. Ele é responsável por 40 a 60% do *turnover* total de proteínas, e possui importantes funções no fluxo de substratos e de nitrogênio no organismo e no suprimento de aminoácidos durante o jejum e durante a ocorrência de ferimentos e doenças (RENNIE, 1985). Por isso, tanto o ritmo de proteólise quanto o de síntese, nesse tecido, precisam ser precisamente controlados. Já é bem estabelecido que a síntese de proteínas musculares é um processo muito mais lento do que o transporte de aminoácidos através da membrana das células musculares. Assim, o transporte dos aminoácidos não é considerado um limitador do processo de síntese (MACKENZIE et al., 1992).

Uma das principais atividades metabólicas do músculo esquelético é o suprimento energético, especialmente de substratos gliconeogênicos (FELIG et al., 1970; MARLISS et al., 1971). Nesse trabalho, as STC1 e STC2 não afetaram a oxidação do aminoácido alanina no tecido muscular, independentemente da dose utilizada dos hormônios. No entanto, nesse mesmo tecido, a STC2, em todas as doses utilizadas, aumentou a formação de CO₂ a partir da ¹⁴C-Leucina. Esta diferença de resposta pode ser explicada pelo papel da alanina e da leucina no metabolismo muscular e como substrato energético no fígado.

A alanina é o principal aminoácido exportado pelo músculo esquelético para a circulação sanguínea. Essa preferência pela exportação de alanina não pode ser explicada pela disponibilidade desse aminoácido nas proteínas musculares, já que a alanina corresponde a não mais do que 10% do conteúdo das proteínas no músculo, mas também corresponde a 30% ou mais do fluxo de aminoácidos para o leito esplâncnico (FELIG, 1975). Baseado nessa alta exportação da alanina pelo músculo, e nas evidências que mostram que esse aminoácido é um precursor importante da glicose no fígado, foi proposto o ciclo da glicose-alanina (FELIG et al., 1970; MALLETTTE et al., 1969). Nesse ciclo, tanto a

alanina existente no tecido muscular como aquela sintetizada nesse tecido a partir dos aminoácidos com cadeia lateral ramificada, é transportada para o fígado onde o seu esqueleto carbônico é reconvertido em glicose através da via gliconeogênica (FELIG, 1975). O transporte de nitrogênio do músculo para o fígado como alanina ocorre quase que continuamente por todo o ciclo jejum-alimentação diário (SMITH et al., 2007). Portanto, o destino principal da alanina muscular não é a oxidação desse substrato para a geração de energia no próprio tecido muscular e sim a exportação desse aminoácido para o fígado. Logo, a regulação hormonal da oxidação da alanina no músculo esquelético não é um processo esperado, e talvez, por isso, as STCs não tenham exercido nenhuma ação sobre esse parâmetro.

Por outro lado, os aminoácidos com cadeia lateral ramificada formam uma porção significativa da composição de proteínas em geral. Esses aminoácidos exercem um papel especial no músculo, pois são os principais aminoácidos oxidados neste tecido, sendo utilizados como substratos energéticos pelo tecido muscular. O primeiro passo da rota é a transaminação dos aminoácidos ramificados pela aminotransferase de cadeia ramificada (BCAT – *branched-chain aminotransferase*). Como resultado, três diferentes α -cetoácidos são produzidos e estes são oxidados usando uma mesma desidrogenase de α -cetoácidos ramificados, produzindo três derivados CoA diferentes. As rotas oxidativas da valina e da isoleucina convertem o esqueleto de carbono tanto em succinil-CoA quanto em acetil-CoA. Especificamente a leucina é cetogênica, no sentido de que ela é convertida em acetil-CoA e acetoacetil-CoA, que são oxidados diretamente pelo CAT para gerar CO_2 .

A oxidação de acetil-CoA e a conservação dessa energia como NADH e FADH_2 são essenciais para a produção de ATP (SMITH et al., 2007). Já foi sugerido um papel estimulatório da STC1 na síntese de ATP, devido às observações de que esse hormônio é capaz de acelerar o metabolismo mitocondrial (MCCUDDEN et al., 2002). Portanto, o resultado encontrado no presente trabalho sugere que a STC2 também possui a capacidade de estimular a síntese de ATP no músculo esquelético via oxidação da leucina. Contrariamente, em macrófagos, Sheikh-Hamad (2010) propôs que a STC1 reduziria a síntese de ATP por indução da UCP2. Especificamente, este trabalho mostra o efeito da STC2 sobre o aumento da oxidação da leucina em CO_2 e não sobre a fosforilação oxidativa.

O ritmo de síntese proteica/mobilização é regulado pelos hormônios que são críticos na homeostase energética como, por exemplo, a insulina. A insulina aumenta a incorporação de vários aminoácidos em proteínas musculares. Os mecanismos pelo qual esse hormônio estimula a síntese proteica não são completamente conhecidos, mas sabe-se que o efeito do hormônio não é devido a qualquer estímulo no transporte de aminoácidos (MOHAN et al., 1991). Provavelmente a insulina tenha um efeito generalizado na iniciação da tradução e na inibição da proteólise lisossomal (SMITH et al., 2007) e também na inibição do sistema proteolítico ubiquitina-proteassoma. Outro hormônio que possui um papel importante sobre o metabolismo proteico muscular é a adrenalina, que inibe a

atividade proteolítica dependente de cálcio, como demonstrado em mamíferos e aves (KADOWAKI et al., 1996; NAVEGANTES et al., 2001; SHAMOON et al., 1980).

Neste trabalho, as STC1 e STC2 não foram capazes de alterar a incorporação de alanina em proteínas no tecido muscular. Especula-se que esse tecido não possua mecanismos hormonais capazes de afetar esse parâmetro visto que a síntese de proteínas não é o principal destino da alanina captada pelo músculo e sim é a transferência para o fígado através do ciclo glicose-alanina. Por outro lado, o tecido muscular metaboliza os aminoácidos com cadeia lateral ramificada muito bem (MOHAN et al., 1991). Quando a síntese de proteínas é estimulada em situações anabólicas, como após uma refeição, a concentração intramuscular dos aminoácidos de cadeia lateral ramificada cai, pois estes estão sendo incorporados em proteínas. Em oposição, durante o jejum ou em uma dieta com baixa concentração de aminoácidos, a concentração de aminoácidos livres aumenta. No tecido muscular, as variações na concentração dos aminoácidos de cadeia ramificada são maiores que aquelas observadas para qualquer outro aminoácido. Essa observação deve-se ao fato de que a razão entre os aminoácidos que estão incorporados em proteínas e os que estão livres é maior para os aminoácidos ramificados do que para qualquer outro grupo de aminoácidos. Assim, os aminoácidos de cadeia ramificada formam uma parte substancial da proteína muscular, correspondendo a um quinto dessa reserva (MACKENZIE et al., 1992).

Já foi demonstrado que a incubação do músculo diafragma com insulina estimula a incorporação de ^{14}C -Leucina em proteínas neste tecido (GOLDSTEIN & REDDY, 1968). Nos resultados aqui apresentados, observa-se que o hormônio STC2, na dose de 0,1ng/mL, estimulou a síntese de proteínas a partir do aminoácido leucina no músculo gastrocnêmio. Já um efeito da STC1 sobre a síntese de proteínas não foi observado neste tecido. Esse resultado está em consonância com a estimulação, pela STC2, da síntese de proteínas a partir de leucina observada também no tecido hepático. Isso reforça a hipótese de que a STC2 possa apresentar um papel no anabolismo, estimulando a síntese de substratos energéticos e, por isso, esse hormônio tem uma preferência de atuação sobre aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam que os hormônios STC1 e STC2 participam do controle do metabolismo intermediário em mamíferos. Especificamente, o trabalho demonstra que estes hormônios atuam sobre vias de síntese e de geração de energia regulando o metabolismo de aminoácidos. A STC1 diminuiu a captação do análogo de aminoácido ácido 2-(metilamino) isobutírico, diminuiu a atividade da enzima malato desidrogenase mitocondrial (MDH) e estimulou a síntese de glicogênio a partir da alanina. Todas as ações da STC1 ocorreram no tecido hepático, e esse hormônio não afetou nenhum parâmetro do tecido muscular. No fígado, a STC2 diminuiu a atividade da enzima malato desidrogenase (MDH) mitocondrial, estimulou a síntese de proteínas a partir de leucina, e estimulou a síntese de glicogênio a partir de alanina. Já no músculo, a STC2 estimulou a oxidação de leucina e a incorporação desse aminoácido em proteínas.

Portanto, com exceção da ação da STC2 sobre a enzima MDH mitocondrial hepática, as ações da STC2 sugerem um papel anabólico, talvez *insulina-like*, desse hormônio em ambos os tecidos. A mesma afirmação não pode ser feita para a STC1, que apresentou efeitos antagônicos no tecido hepático. Logo, o presente trabalho sugere que a STC1 e a STC2 ou atuam sobre receptores distintos ou possuem uma cascata de ativação intracelular distinta, pois esses hormônios apresentaram ações distintas. Além disso, esses hormônios também podem possuir receptores tecido-específicos, pois tanto a STC1 quanto a STC2 apresentaram ações diferentes quando foram adicionadas ao fígado e ao músculo.

Outro achado importante do trabalho foi o fato de que as ações da STC1 e da STC2 sobre as vias metabólicas dos aminoácidos foram demonstradas com a utilização de doses muito mais baixas desses hormônios do que aquelas utilizadas em outros trabalhos encontrados na literatura. Na maioria dos experimentos, a dose de 0,1ng/mL de STC1 ou de STC2 foi suficiente para gerar algum efeito sobre a via analisada; no entanto, a diminuição da atividade da MDH pela STC1 e STC2 e o estímulo da oxidação da leucina pela STC já foram significativas quando a dose de 0,01ng/mL foi utilizada. Esse achado está de acordo com a hipótese atual de que as STCs, em mamíferos, agem de forma parácrina, autócrina ou intrácrina.

Por fim, conforme Wagner & DiMattia (2006): “O que aprendemos até agora sobre as STCs é apenas a ponta de um “iceberg” muito grande. Há muito mais que nós não sabemos ou mesmo imaginamos sobre esses ligantes”. Os resultados obtidos no presente trabalho elucidam um pouco do papel da STC1 e da STC2 sobre o metabolismo de aminoácidos em mamíferos, mas a consolidação do conhecimento sobre as ações metabólicas desses hormônios ainda necessita de estudos aprofundados

sobre os mecanismos de transdução de sinal e de controle sobre as diferentes vias metabólicas e os substratos energéticos utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

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

BOYD, R. D.; MOSER, B. D.; LEWIS, A. J.; PEO, E. R.; JOHNSON, R. K.; NIMMO, R. D. Effect of maternal dietary energy-source on glucose-homeostasis, liver-glycogen and carcass lipid in the neonatal pig. **Journal of Animal Science**, v. 53, p. 1316-1324, 1981.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHAN, K. M.; DELFERT, D.; JUNGER, K.D. A direct colorimetric assay for Ca²⁺- stimulated ATPase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 157, p. 375-380, 1986.

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

CHANG, A. C.; DUNHAM, M. A.; JEFFREY, K. J.; REDDEL, R. R. Molecular cloning and characterization of mouse stanniocalcin cDNA. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 124, p. 185-187, 1996.

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

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

CHRISTENSEN, H. N.; CULLEN, A. M. Effects of non-metabolizable analogs on the distribution of amino acids in the rat. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 150, p. 237-252, 1968.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

² De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

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

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

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

DOI, M.; YAMAOKA, I.; NAKAYAMA, M.; SUGAHARA, K.; YOSHIZAWA, F. Hypoglycemic effect of isoleucine involves increased muscle glucose uptake and whole body glucose oxidation and decreased hepatic gluconeogenesis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 292, p. 683-693, 2007.

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

ESMANN, M. ATPase and phosphatase activity of Na⁺, K⁺-ATPase: Molar and specific activity, protein determination. In: FLEISCHER, S.; FLEISCHER, B. (Ed.) **Methods in Enzymology: Biomembranes Part P**. New York: Academic Press, 1988. v. 156, c. 10, p. 105-115.

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

FELIG, P.; POSEFSKY, T.; MARLISS, E.; CAHILL, G. F. Alanine: key role in gluconeogenesis. **Science**, v. 167, p. 1003-1004, 1970.

FELIG, P. Amino acid metabolism in man. **Annual Review of Biochemistry**, v. 44, p. 933-945, 1975.

FELIG, P.; WAHREN, J.; HENDLER, R. Influence of oral glucose ingestion on splanchnic glucose and gluconeogenic substrate metabolism in man. **Diabetes**, v. 24, p. 468-475, 1975.

FILVAROFF, E. H.; GUILLET, S.; ZLOT, C.; BAO, M.; INGLE, G.; STEINMETZ, H.; HOEFFEL, J.; BUNTING, S.; ROSS, J.; CARANO, R. A.; POWELL-BRAXTON, L.; WAGNER, G. F.; ECKERT, R.; GERRITSEN, M. E.; FRENCH, D. M. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. **Endocrinology**, v. 143, p. 3681-3690, 2002.

FLIK, G.; VERBOST, P. M. Calcium transport in fish gills and intestine. **Journal of Experimental Biology**, v. 184, p. 17-29, 1993.

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

GAGLIARDI, A. D.; KUO, E. Y.; RAULIC, S.; WAGNER, G. F.; DIMATTIA, G. E. Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 288, p. E92–105, 2005.

GARLICK, P. J.; MILLWARD, D. J.; JAMES, P. T. The diurnal response of muscle and liver protein synthesis *in vivo* in meal-fed rats. **Biochemical Journal**, v. 136, p. 935-945, 1973.

GOLDSTEIN, S.; REDDY, W. J. Insulin stimulation of [¹⁴C]leucine into protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 150, p. 730-733, 1968.

GONÇALVES, A. S. **Efeitos dos hormônios peptídicos Stanniocalcina 1 e Stanniocalcina 2 sobre o metabolismo da glicose em ratos**. 2012. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

GUERREIRO, P. M.; RENFRO, J. L.; POWER, D. M.; CANARIO, A. V. M. Parathyroid hormone-related protein: a calcium regulatory factor in sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, p. R679-R696, 2007.

GUIDOTTI, G. G.; GAZZOLA, G. C. Amino acid transporters: systematic approach and principles of control. In: KILBERG, M. S.; HÄUSSINGER, D. (Ed.) **Mammalian Amino Acid Transport: Mechanisms and Control**. New York: Plenum Press, 1992. c. 1, p. 3-29.

GUMÀ, A.; MORA, C.; SANTALUCIA, T.; VIÑALS, F.; TESTAR, X.; PALACIN, M.; ZORZANO, A. System A transport activity is stimulated in skeletal muscle in response to diabetes. **The FEBS Journal**, v. 310, p. 51-55, 1992.

HASILO, C. P.; MCCUDDEN, C. R.; GILLESPIE, J. R. J.; JAMES, K. A.; HIRV, E. R.; WAGNER, G. F. Nuclear targeting of big stanniocalcin to mammary gland alveolar cells during pregnancy and lactation. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 289, p. E634-E642, 2005.

HÄUSSINGER, D. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. **Biochemical Journal**, v. 267, p. 281-290, 1990.

HÄUSSINGER, D. Neural control of hepatic osmolytes and parenchymal cell hydration. **Anatomical Record Part A – Discoveries in Molecular, Cellular and Evolutionary Biology**, v. 280, p. 893-900, 2004.

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

ISHIBASHI, K.; MIYAMOTO, K.; TAKETAMI, Y.; MORITA, K.; TAKEFA, E.; SASAKI, S.; IMAI, M. Molecular cloning of a second human stanniocalcin homologue (STC2). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 250, p. 252–258, 1998.

ISHIBASHI, K.; IMAI, M. Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v. 282, p. F367-F375, 2002.

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

JIANG, W. Q.; CHANG, A. C.; SATOH, M.; FURUICHI, Y.; TAM, P. P.; REDDEL, R. R. The distribution of stanniocalcin 1 protein in fetal mouse tissues suggests a role in bone and muscle development. **Journal of Endocrinology**, v. 165, p. 457–466, 2000.

KADOWAKI, M.; KAMATA, T.; NOGUCHI, T. Acute effect of epinephrine on muscle proteolysis in perfused rat hindquarters. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 270, p. E961–E967, 1996.

KEMPSON, S. A.; EDWARDS, J. M.; STUREK, M. Inhibition of the renal betaine transporter by calcium ions. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v. 291, p. F305-F313, 2006.

KILBERG, K. S.; HÄUSSINGER, D. Amino acid transport in liver. In: KILBERG, M. S.; HÄUSSINGER, D. (Ed.) **Mammalian Amino Acid Transport: Mechanisms and Control**. New York: Plenum Press, 1992. c. 9, p. 133-147.

LAFEBER, F. P.; HERRMANN-ERLEE, M. P.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E. Rainbow trout hypocalcin stimulates bone reabsorption in embryonic mouse calvaria in vitro in a PTH-like fashion. **Journal of Experimental Biology**, v. 143, p. 165-175, 1989.

LAL, A.; PETERS, H.; ST. CROIX, B.; HAROON, Z. A.; DEWHIRST, M. W.; STRAUSBERG, R. L.; KAANDERS, J. H.; VAN DER KOGEL, A. J.; RIGGINS, G. J. Transcriptional response to hypoxia in human tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, p. 1337-1343, 2001.

LANG, F.; BUSCH, G. L.; VOLKL, H. The diversity of volume regulatory mechanisms. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 8, p. 1-45, 1998.

LAW, A. Y.; CHING, L. Y.; LAI, K. P.; WONG, C. K. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element in human stanniocalcin-1 gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, p. 118–127, 2010.

LERNER, J. Effectors of amino acid transport processes in animal cell membranes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 81, p. 713-739, 1985.

LIU, D.; JIA, H.; HOLMES, D. I.; STANNARD, A.; ZACHARY, I. Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 2002–2007, 2003.

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

LUO, C. W.; KAWAMURA, K.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. Paracrine regulation of ovarian granulosa cell differentiation by stanniocalcin (STC) 1: mediation through specific STC1 receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 2085–2096, 2004.

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

LUO, C.; WANG, X.; LONG, J.; LIU, J. An NADH-tetrazolium-coupled sensitive assay for malate dehydrogenase in mitochondria and crude tissue homogenates. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 68, p. 101-111, 2006.

MACHADO, V. L. A.; WASSERMANN, G. F.; MARQUES, M. *In vitro* effect of insulin on the uptake of glucose and α -aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorsibigni*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 82, p. 8-13, 1991.

MACKENZIE, B.; AHMED, A.; RENNIE, M. J. Muscle amino acid metabolism and transport. In: KILBERG, M. S.; HÄUSSINGER, D. (Ed.) **Mammalian Amino Acid Transport: Mechanisms and Control**. New York: Plenum Press, 1992. c. 12, p. 195-231.

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.; FEDORAK, R. N. Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 274, p. G96-G102, 1998.

MALLETTE, L. E.; EXTON, J. H.; PARK, C. R. Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 5713-5723, 1969.

MARIEB, L. N.; HOEHN, K. **Anatomia e Fisiologia**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MARLISS, E. B.; AOKI, T. T.; POZEFSKY, T.; MOST, A. S.; CAHILL, G. F. Muscle and splanchnic glutamine and glutamate metabolism in postabsorptive and starved man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 50, p. 814-817, 1971.

MCCUDDEN, C. R.; JAMES, K. A.; HASILO, C.; WAGNER, G. F. Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 45249-45258, 2002.

MCNURLAN, M. A.; TOMKINS, A. M.; GARLICK, P. J. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. **Biochemical Journal**, v. 179, p. 373-379, 1979.

MIAO, D.; HE, B.; TONG, X. K.; GOLTZMAN, D.; KARAPLIS, A. C. J. Conditional knockout of PTHrP in osteoblasts leads to premature osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, p. S138-S138, 2002.

MOHAN, C.; BESSMAN, S. P. Anabolic regulation of gluconeogenesis by insulin in isolated rat hepatocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 242, p. 563-573, 1986.

MOHAN, C.; MEMON, R. A.; BESSMAN, S. P. Amphibolic role of the Krebs Cycle in the insulin-stimulated protein synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 289, p. 83-89, 1991.

MOORE, E. E.; KUESTNER, R. E.; CONKLIN, D. C.; WHITMORE, T. E.; DOWNEY, W.; BUDDLE, M. M.; ADAMS, R. L.; BELL, L. A.; THOMPSON, D. L.; WOLF, A.; CHEN, L.; STAMM, M. R.; GRANT, F. J.; LOK, S.; REN, H.; DE JONGH, K. S. Stanniocalcin 2: characterization of the protein and its localization to human pancreatic alpha cells. **Hormone and Metabolic Research**, v. 31, p. 406-414, 1999.

MOORE, M. C.; CHERRINGTON, A. D.; CLINE, G.; PAGLIASSOTI, M. J.; JONES, E. M.; NEAL, D. W.; BADET, C.; SHULMAN, G. L. Sources of carbon for hepatic glycogen synthesis in the conscious dog. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 578-587, 1991.

MORTIMORE, G. E.; MONDON, C. E. Inhibition by insulin of valine turnover in liver: evidence for a general control of proteolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 2375-2383, 1970.

NAVEGANTES, L. C. C.; RESANO, N. M. Z.; MIGLIORINI, R. H.; KETTELHUT, I. C. Catecholamines inhibit Ca^{2+} -dependent proteolysis in rat skeletal muscle through β_2 -adrenoceptors and cAMP. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 281, p. E449-E454, 2001.

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

OCHOA, S. Malic dehydrogenase from pig heart. In: COLOWICK, S. P.; KAPLAN, N. O. (Ed.) **Methods in Enzymology**: Preparation and Assay of Enzymes. New York: Academic Press, 1955. v. 1, c. 123, p. 735-739.

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

OLSEN, H. S.; CEPEDA, M. A.; ZHANG, Q. Q.; ROSEN, C. A.; VOZZOLO, B. L. Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 1792-1796, 1996.

PACIGA, M.; MCCUDDEN, C. R.; LONDOS, C.; DIMATTIA, G. E.; WAGNER, G. F. Targeting of big stanniocalcin and its receptor to lipid storage droplets of ovarian steroidogenic cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 49549-49554, 2003.

PACIGA, M.; DIMATTIA, G. E.; WAGNER, G. F. Regulation of luteal cell big stanniocalcin production and secretion. **Endocrinology**, v. 145, p. 4204-4212, 2004.

PACIGA, M.; HIRVI, E. R.; JAMES, K.; WAGNER, G. F. Characterization of big stanniocalcin variants in mammalian adipocytes and adrenocortical cells. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 289, p. E197-E205, 2005.

PAIN, V. M.; GARLICK, P. J. Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 4510-4514, 1974.

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

RENNIE, M. J. Muscle and protein turnover and the wasting due to injury and disease. **British Medical Bulletin**, v. 41, p. 257-264, 1985.

RICHARDSON, N. A.; ANDERSON, A. J.; SARA, V. R. The effects of insulin/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 105, p. 287-293, 1997.

SAZONOVA, O.; JAMES, K. A.; MCCUDDEN, C. R.; SEGAL, D.; TALEBIAN, A.; WAGNER, G. F. Stanniocalcin-1 secretion and receptor regulation in kidney cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 294, p. F788-F794, 2008.

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

SHARFF, R.; WOOL, I. G. Effect of diabetes on the concentration of amino acids in plasma and heart muscle of rats. **Biochemical Journal**, v. 99, p. 173-178, 1966.

SHAMOON, H.; JACOB, R.; SHERWIN, R. S. Epinephrine-induced hypoaminoacidemia in normal and diabetic human subjects. Effect of beta blockade. **Diabetes**, v. 29, p. 875-881, 1980.

SHEIKH-HAMAD, D.; ROUSE, D.; YANG, Y. Regulation of stanniocalcin in MDCK cells by hypertonicity and extracellular calcium. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 278, p. F417-F424, 2000.

SHEIKH-HAMAD, D.; BICK, R.; WU, G. Y.; CHRISTENSEN, B. M.; RAZEGHI, P.; POINDEXTER, B.; TAEGTMEYER, H.; WAMSLEY, A.; PADDA, R.; ENTMAN, M.; NIELSEN, S.; YOUKER, K. Stanniocalcin-1 is a naturally occurring L-channel inhibitor in cardiomyocytes: relevance to human heart failure. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, p. H442-H448, 2003.

SHEIKH-HAMAD, D. Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 298, p. F248-F254, 2010.

SHOTWELL, M. A.; JAYME, D. W.; KILBERG, M. S.; OXENDER, D.L. Neutral amino acid transport system in chinese hamsters ovary cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 5422-5427, 1981.

SHOTWELL, M. A.; KILBERG, M. S.; OXENDER, D. L. The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 737, p. 267-284, 1983.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: Uma abordagem integrada**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica Médica Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

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

STASKO, S. E.; WAGNER, G. F. Possible roles for stanniocalcin during early skeletal patterning and joint formation in the mouse. **Journal of Endocrinology**, v. 171, p. 237-248, 2001a.

STASKO, S. E.; WAGNER, G. F. Stanniocalcin gene expression during mouse urogenital development: a possible role in mesenchymal-epithelial signaling. **Developmental Dynamics**, v. 220, p. 49-50, 2001b.

SUNDELL, K.; BJORNSSON, B. T.; ITOH, H.; KAWAUCHI, H. Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) stanniocalcin inhibits in vitro intestinal calcium uptake in Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 162, p. 489–95, 1992.

TOHMIYA, Y.; KOIDE, Y.; FUJIMAKI, S.; HARIGAE, H.; FUNATO, T.; KAKU, M.; ISHII, T.; MUNAKATA, Y.; KAMEOKA, J.; SASAKI, T. Stanniocalcin-1 as a novel marker to detect minimal residual disease of human leukemia. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 125–133, 2004

THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 279, p. C541-C566, 2000.

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

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

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

VARGHESE, R.; GAGLIARDI, A. D.; BIALEK, P. E.; YEE, S. P.; WAGNER, G. F.; DIMATTIA, G. E. Overexpression of human stanniocalcin affects growth and reproduction in transgenic mice. **Endocrinology**, v. 143, p. 868-876, 2002.

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

WAGNER, G. F. The molecular biology of the corpuscles of Stannius and regulation of stanniocalcin gene expression. In: SHERWOOD, N.; HEW, C. (Ed.) **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1994. c. 9, v. 13.

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

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. Human stanniocalcin inhibits renal phosphate excretion in the rat. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, p. 165-171, 1997.

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

XIAO, L. J.; YUAN, J. X.; SONG, X. X.; LI, Y. C.; HU, Z. Y.; LIU, Y. X. Expression and regulation of stanniocalcin 1 and 2 in rat uterus during embryo implantation and decidualization. **Reproduction**, v. 131, p. 1137–1149, 2006.

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

YOSHIKO, Y.; KOSUGI, T.; KOIDE, Y. Effects of a synthetic N-terminal fragment of stanniocalcin on the metabolism of mammalian bone in vitro. **Biochemistry and Biophysical Acta**, v. 1311, p. 143-149, 1996.

YOSHIKO, Y.; AUBIN, J. E.; MAEDA, N. Stanniocalcin 1 (STC1) protein and mRNA are developmentally regulated during embryonic mouse osteogenesis: the potential of STC1 as an autocrine/paracrine factor for osteoblast development and bone formation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, p. 483-492, 2002.

ZAIDI, D.; JAMES, K. A.; WAGNER, G. F. Passive immunization of lactating mice with stanniocalcin-1 antiserum reduces mammary gland development, milk fat content and postnatal pup growth. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 291, p. E974-E981, 2006.

ZHANG, K. Z.; WESTBERG, J. A.; PATEAU, A.; VON BOGULAWSKY, K.; LINDSBERG, P. J.; ERLANDER, M.; GIO, H.; SU, J.; OLSEN, H. S.; ANDERSSON, L. C. High expression of stanniocalcin in differentiated brain neurons. **The American Journal of Pathology**, v. 153, p. 439-445, 1998.

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