

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Departamento de Bioquímica

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

EFEITOS DA STANNIOCALCINA 1 NA VIABILIDADE NEURONAL EM UM
MODELO DE ISQUEMIA *IN VITRO* E EM CÉLULAS SH-SY5Y INDIFERENCIADAS
E DIFERENCIADAS

BÁRBARA PARANHOS COELHO

Orientadora: Dra. Vanessa Schein

Co-Orientadora: Prof. Dra. Christianne Salbego

Porto Alegre, 2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

EFEITOS DA STANNIOCALCINA 1 NA VIABILIDADE NEURONAL EM UM
MODELO DE ISQUEMIA *IN VITRO* E EM CÉLULAS SH-SY5Y INDIFERENCIADAS
E DIFERENCIADAS

BÁRBARA PARANHOS COELHO

Orientadora: Dra. Vanessa Schein

Co-Orientadora: Profa. Dra. Christianne Salbego

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas ICBS – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

2013

“Science may be described as the art of systematic over-simplification”

Karl Popper, filósofo

AGRADECIMENTOS

À Vanessa Schein pelos ensinamentos e pela orientação do projeto.

À Profa. Christianne Salbego pela parceria no trabalho com as culturas organotípicas.

À Profa. Fátima Guma por me acolher de volta ao seu laboratório e pelas contribuições ao projeto.

À Silvia Resende Terra pela amizade e toda a ajuda com os experimentos, sem a qual este projeto não teria sido realizado.

À Letícia Pettenuzzo pela amizade e ajuda nas estatísticas, além de conversas esclarecedoras sobre mitocôndrias.

Ao Fernando Kreutz, à Fernanda Petry e às meninas do lab. 25 pela amizade e ajuda indispensável com as células de neuroblastoma.

À Elisa N. Simões Pires, por todo o auxílio com as culturas organotípicas e aos colegas do lab. 23 que estavam sempre dispostos a ajudar, em especial a Mariana Maier.

Ao Leo A. Meira Martins pela amizade, auxílio com experimentos e pelas conversas que contribuíram bastante para este projeto.

À todos os colegas do lab. 21 e à Florencia Barbe-Tuana, que contribuíram para este projeto seja com a amizade, seja com auxílio nas técnicas.

Aos meus pais e à minha irmã por todo apoio e por sempre me inspirarem a ir mais longe.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Stanniocalcina.....	1
1.1.1. Stanniocalcina em peixes.....	1
1.1.2. Stanniocalcina em mamíferos.....	1
1.1.3. Funções biológicas da Stanniocalcina em mamíferos.....	5
1.1.3.1. Regulação da homeostasia de Ca_{2+} e P_i	5
1.1.3.2. Diferenciação celular.....	6
1.1.3.3. Metabolismo.....	7
1.1.3.4. Câncer.....	8
1.1.3.5. Apoptose.....	10
1.1.3.6. Sistema Nervoso Central.....	11
1.2. Isquemia cerebral.....	12
1.2.1. Modelo experimental de isquemia.....	14
1.3. Neuroblastoma.....	14
1.3.1. Linhagem SH-SY5Y.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos Gerais.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Animais.....	18
3.2. Imunohistoquímica.....	18
3.3. Cultura organotípica de hipocampo.....	19
3.3.1. Procedimento de cultivo.....	19
3.3.2. Privação de oxigênio e glicose.....	20
3.3.3. Tratamento com Stanniocalcina 1.....	20
3.3.4. Quantificação da morte celular.....	21
3.4. Células de neuroblastoma.....	21

3.4.1. Cultivo de células SH-SY5Y.....	21
3.4.2. Tratamento com Stanniocalcina 1.....	22
3.4.3. Quantificação da morte celular.....	22
3.4.4. Western-blotting.....	23
3.4.5. q-RT-PCR.....	24
3.4.6. Quantificação protéica.....	25
3.5. Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Análises da expressão de Stanniocalcina 1 no hipocampo de ratos por imunohistoquímica.....	27
4.2. Efeitos da Stanniocalcina 1 sobre o modelo experimental de isquemia.....	31
4.3. Efeitos do tratamento com Stanniocalcina 1 na linhagem de células de neuroblastoma SH-SY5Y.....	33
4.4. Análise da expressão protéica de Caspase 3 por Western-blotting.....	34
4.5. Análises das expressões gênicas da Caspase 3 e da Stanniocalcina 1 por q-RT-PCR.....	36
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES.....	45
7. PERSPECTIVAS.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

RESUMO

A Stanniocalcina 1 (STC1) é um hormônio anti-hipercalcêmico em peixes e, em mamíferos, ela é um hormônio com funções endócrinas, parácrinas e autócrinas. Em mamíferos, a STC1 tem efeitos na regulação da homeostasia celular de cálcio (Ca^{2+}) e fosfato inorgânico, no metabolismo, na diferenciação celular, na apoptose e no câncer. A STC1 também é considerada neuroprotetora por ser observado aumento da sua expressão no encéfalo de ratos após infarto-isquêmico. A isquemia é resultado de uma redução de fluxo sanguíneo aos tecidos. No encéfalo, a isquemia causa morte neuronal devido à incapacidade dos neurônios em manter a demanda de ATP e de conter o acúmulo de Ca^{2+} intracelular. A privação de oxigênio e glicose (POG) é um modelo de isquemia *in vitro* muito utilizado em culturas organotípicas de hipocampo. O neuroblastoma é um tumor pediátrico sólido extracranial, o qual possui propensão a diferenciação espontânea ou induzida por agentes farmacológicos como o ácido retinóico (AR). A linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y pode ser mantida em um fenótipo indiferenciado ou pode ser diferenciada para um fenótipo neuronal por tratamento com AR. O objetivo geral desse estudo foi analisar a distribuição de STC1 no hipocampo de ratos em idades diferentes e avaliar os efeitos da STC1 na viabilidade de culturas organotípicas de hipocampo submetidas à POG e em células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas com ácido *all-trans*-retinóico (atAR). Para isso, foram utilizadas as técnicas de imunohistoquímica, análise de marcação celular com iodeto de pródio e Hoechst, Western-blotting para Caspase 3 total e clivada e q-RT-PCR para o RNA mensageiro da *stc1* e da *caspase3* (*casp3*). A STC1 possui distribuição celular diferente em ratos de 21 dias de idade em comparação com animais de 6 e 60 dias de vida. A STC1 não protegeu as culturas organotípicas de hipocampo do dano causado pela POG e apresentou efeito neurotóxico nessas culturas. Em células SH-SY5Y diferenciadas, a STC1 apresentou efeito neurotóxico dose-dependente e a morte celular foi provocada por apoptose. Em células SH-SY5Y indiferenciadas, a STC1 também provocou clivagem de Caspase 3, porém não foi observado aumento de morte celular. A diferenciação de SH-SY5Y em neurônios leva ao aumento da expressão de *stc1*. O tratamento com STC1 humana recombinante não altera a expressão basal de *stc1* e de *casp3* em SH-SY5Y indiferenciadas ou diferenciadas. Nossos resultados, portanto, demonstram um possível papel da Stanniocalcina no desenvolvimento hipocampal em ratos jovens e um efeito neurotóxico do tratamento com STC1 em culturas organotípicas de hipocampo e em células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios.

Palavras-chave: stanniocalcina 1, neuroblastoma, diferenciação, caspase 3

ABSTRACT

Stanniocalcin 1 (STC1) is an anti-hypercalcemic hormone in fish, and it is an endocrine, paracrine and autocrine hormone in mammals. Mammalian STC1 has effects in the regulation of cell calcium (Ca^{2+}) and inorganic phosphate homeostasis, as well as effects in cell metabolism, cellular differentiation, apoptosis and cancer. STC1 is also considered to be neuroprotective, due to increased expression of STC1 in the brain of rats after ischemic stroke. Ischemia occurs from a reduction in blood flow to tissues. In the brain, ischemia causes neuronal death due to the inability of neurons to maintain ATP demands and to contain the accumulation of intracellular Ca^{2+} . Oxygen and glucose deprivation (OGD) is an *in vitro* model of ischemia widely used in organotypic hippocampal slice cultures. Neuroblastoma is an extracranial solid tumor in children, and it has the propensity to spontaneously differentiate or to be induced to differentiation by pharmacological agents, such as retinoic acid (RA). The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y can be maintained in an undifferentiated phenotype or can be differentiated into a neuronal phenotype by treatment with RA. The main objective of this study was to analyze the cellular distribution of STC1 in the hippocampus of rats with different ages and evaluate the effects of STC1 on the viability of organotypic hippocampal slice cultures subjected to OGD and undifferentiated SH-SY5Y cells and cells differentiated with all-trans-retinoic acid (atAR). Therefore, we used immunohistochemistry, analysis of cell labeling with propidium iodide and Hoechst, Western blotting for total- and cleaved-Caspase-3 and q-RT-PCR for STC1 and caspase3 (*casp3*) mRNAs. STC1 is differentially distributed in the hippocampus of 21 days old rats in comparison with 6 and 60 days old rats. STC1 did not protect organotypic hippocampal cultures against damage caused by OGD and it also had neurotoxic effects in these cultures. In differentiated SH-SY5Y cells, STC1 had neurotoxic effects in a dose-dependent manner and cell death was caused by apoptosis. In undifferentiated SH-SY5Y cells, STC1 also caused cleavage of Caspase 3, but did not increase cell death. The differentiation of SH-SY5Y cells upregulates *stc1* expression. Treatment of undifferentiated and differentiated SH-SY5Y, however, did not alter the basal expression of *stc1* and of *casp3*. Our results demonstrate, therefore, a possible role of STC1 in the development of the hippocampus of young rats and a neurotoxic effect in organotypic hippocampal cultures and in SH-SY5Y cells differentiated in neurons.

Keywords: stanniocalcin 1, neuroblastoma, differentiation, caspase 3

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – Ácido retinóico

atAR – Ácido all-trans-retinóico

Ca²⁺ – Cálcio

CS – Corpúsculos de Stannius

dbcAMP – Dibutilil AMP cíclico

GD – Giro denteado

HBSS – Hank's balanced salt solution

HIF-1 – Fator induzível pela hipóxia 1

hrSTC1 – Stanniocalcina 1 humana recombinante

IP – Iodeto de propídio

Ir-STC1 – Imunorreatividade à STC1

KO – *Knockout*

MLC – Miosina de cadeia leve músculo-específica

mRNA – RNA mensageiro

PBS – Tampão fosfato salino

Pi – Fosfato inorgânico

PMA – Forbol 12-miristato 13-acetato

POG – Privação de oxigênio e glicose

q-RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

STC – Stanniocalcina

STC1 – Stanniocalcina 1

STC2 – Stanniocalcina 2

UCPs – Proteínas desacopladoras

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura genes <i>STC1</i> em peixes e mamíferos.....	3
Figura 2 Imunohistoquímica do hipocampo de ratos.....	28
Figura 3 Imunohistoquímica do hipocampo de ratos com detalhe em CA1.....	29
Figura 4 Imunohistoquímica do hipocampo de ratos com detalhe em GD.....	30
Figura 5 Marcação de culturas organotípicas com IP e Hoechst.....	32
Figura 6 Marcação de células SH-SY5Y com IP e Hoechst.....	34
Figura 7 Western-blotting de células SH-SY5Y.....	35
Figura 8 q-RT-PCR de <i>stc1</i> e <i>casp3</i>	37

1. INTRODUÇÃO

1.1. Stanniocalcina

1.1.1. Stanniocalcina em peixes

A Stanniocalcina (STC) é uma proteína glicosilada de aproximadamente 50 kDa, que atua como um hormônio anti-hipercalcêmico. Em peixes teleósteos, ela é sintetizada e secretada pelos Corpúsculos de Stannius (CS), e possui ação inibitória sobre os níveis de cálcio (Ca^{2+}) sistêmico, semelhante à calcitonina em mamíferos (ISHIBASHI & IMAI, 2002). Os principais alvos da ação anti-hipercalcêmica da STC são as brânquias (WAGNER et al., 1988) e o intestino (TAKAGI et al., 1985; SUNDELL et al., 1992), nos quais ela age diminuindo a captação de Ca^{2+} , e os rins, onde a STC estimula a reabsorção de fosfato inorgânico (P_i) (LU et al., 1994).

Recentemente, foram encontrados receptores para STC em diversos tecidos, principalmente fígado, músculo e brânquias, além de encéfalo, crânio e até mesmo no CS, sugerindo a possibilidade de um *feedback* autócrino (RICHARDS et al., 2012). Acredita-se também que o sistema de sinalização seja por meio de proteínas G, visto que, em células dos túbulos proximais renais de um peixe pleuronectiforme tratadas com STC, foi demonstrada a ativação da via de segundo mensageiro AMP cíclico-Proteína Cinase A (LU et al., 1994).

1.1.2. Stanniocalcina em mamíferos

Em peixes, a regulação da absorção de Ca^{2+} nas brânquias e intestino é essencial, visto que a maior concentração de Ca^{2+} na água em relação às células causa entrada de Ca^{2+} por difusão no corpo do animal. Mamíferos não correm o risco de se tornar hipercalcêmicos espontaneamente como os peixes, já que a concentração de Ca^{2+} plasmático aumenta de forma transiente após a ingestão de alimento contendo esse íon. Em resposta à hipercalcemia temporária, a calcitonina é secretada para facilitar a transferência do Ca^{2+} para os ossos e normalizar sua concentração no plasma, não havendo necessidade de uma proteína anti-hipercalcêmica adicional (HWANG & LEE, 2007). Além disso, como não existe em mamíferos um órgão semelhante ao CS, a STC foi considerada exclusiva de peixes. No entanto, diversos estudos demonstraram que a STC de peixes possuía ação hipocalcêmica em sapos, aves e ratos, o que sugeriu a presença de um receptor funcional dessa proteína em outros vertebrados (SRIVASTAV & SWARUP, 1982; MILET et al., 1984; MADSEN et al., 1998).

Em 1995, dois laboratórios independentes clonaram o cDNA para o ortólogo humano da *stc* de peixes (CHANG et al., 1995; OLSEN et al., 1996), que foi denominado de STC devido ao alto nível de homologia entre as sequências. Um ano depois, o cDNA da *stc* de camundongos também foi clonado (CHANG et al., 1996), apresentando grande similaridade com o homólogo humano.

Em 1998, foi clonado o cDNA de uma proteína relacionada à STC em peixes e mamíferos (CHANG & REDDEL, 1998; DIMATTIA et al., 1998; ISHIBASHI et al., 1998; MOORE et al., 1999; LUO et al., 2005), a qual passou a ser denominada de Stanniocalcina 2 (STC2). Com isso, a STC foi renomeada para Stanniocalcina 1 (STC1).

A STC2 apresenta apenas 30% de identidade em sequência de aminoácidos com a STC1, mas os limites exon-intron, os sítios de glicosilação e os resíduos de cisteína são conservados entre as duas proteínas. Análises estruturais filogenéticas e genômicas dos genes sugerem que a STC1 e STC2 podem derivar de um mesmo gene ancestral (Fig.1) (WAGNER & DIMATTIA, 2006; SCHEIN et al., 2012).

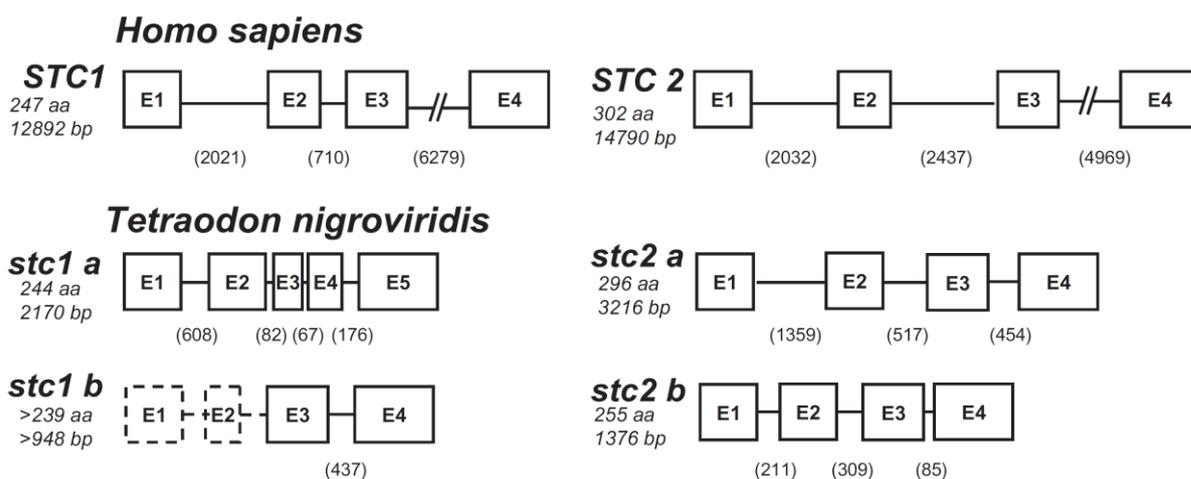


Figura 1: Organização comparativa dos genes *stc* de *Tetraodon nigroviridis* com os genes *stc1* e *stc2* humanos. Estão representadas apenas as estruturas das proteínas maduras. Exons são indicados por caixas e íntrons por linhas. Caixas de exon vazadas representam estruturas não previstas. Adaptado de SCHEIN et al., 2012.

Existem, no entanto, diferenças estruturais e funcionais notáveis entre as duas proteínas. As maiores diferenças estruturais estão na porção carboxiterminal e nos 15 resíduos de histidina da STC2, o que representa cinco vezes mais o número observado na STC1 de peixes e mais do que o dobro do observado na STC1 de mamíferos. Quatro desses resíduos estão agrupados na porção C-terminal da STC2 e parecem interagir com metais de transição (MOORE et al., 1999).

Estudos também demonstraram que a STC2 inibe a captação de fosfato em uma linhagem celular renal (ISHIBASHI et al., 1998) e que ela não é capaz de

deslocar a STC1 de seu receptor putativo (MCCUDDEN et al., 2002). Isso sugere que a STC1 e a STC2 possuem funções distintas e até mesmo antagônicas.

Além disso, as proteínas também apresentam diferenças de expressão. O gene da STC1 é expresso em diversos tecidos de mamíferos, entre eles coração, pulmões, fígado, glândula adrenal, rins, próstata e ovário (CHANG et al., 1995; VARGHESE et al., 1998). Entre os diferentes tecidos, a expressão de STC1 é alta nos ovários, enquanto que o transcrito não é detectado na vesícula seminal e no baço. Acreditava-se que a STC1 não estava normalmente presente no sangue de mamíferos (DE NIU et al., 2000; DEOL et al., 2000). Porém, em 2005, James e colaboradores demonstraram que o hormônio possui sítios de ligação de alta afinidade em hemácias, o que explica a inabilidade de detectar STC1 a níveis séricos (JAMES et al., 2005) e também o fato de que hepatócitos apresentam alta quantidade do hormônio, mas pouco RNA mensageiro (mRNA) (VARGHESE et al., 1998; DE NIU et al., 2000). Mesmo assim, a expressão da proteína em tecidos diversos ainda sugere que a STC1 age como um fator parácrino/autócrino, além de possuir ação endócrina. Em peixes, a expressão da STC1 foi considerada como sendo exclusiva dos CS, até serem detectados mRNAs em ovários, testículos, encéfalo, músculo, intestino e rins (MCCUDDEN et al., 2001; SHIN & SOHN, 2006; SCHEIN et al., 2012). Entretanto, Schein e colaboradores (2012) demonstraram que, em peixes, existem genes duplicados (parálogos) para a *stc1* e para *stc2*. Estes genes duplicados foram nomeados como *stc1-b* e *stc2-b*. A STC1 de peixes, que passou a ser denominada STC1-a, é a proteína sintetizada e secretada pelos CS, cuja principal função é a regulação da concentração de Ca^{2+} sérico. Já a STC1-b não parece ter função essencial no mecanismo de regulação do Ca^{2+} sérico nos peixes teleósteos.

O mRNA da STC2 de peixes e mamíferos também é expresso em tecidos diversos (DIMATTIA et al., 1998; ISHIBASHI et al., 1998; SHIN & SOHN, 2009; SCHEIN et al., 2012). Em mamíferos, a expressão mais abundante de STC2 é encontrada no pâncreas, baço, rins e músculo esquelético. Não existem informações disponíveis no momento em relação aos níveis séricos de STC2 em peixes e mamíferos, mas se acredita que ela também age como um fator parácrino/autócrino.

1.1.3. Funções biológicas da STC1 em mamíferos

1.1.3.1 Regulação da homeostasia de Ca^{2+} e P_i

Estudos com camundongos knockout (KO) para os genes da *stc1* e *stc2* não demonstraram alterações nos níveis séricos de Ca^{2+} e P_i , o que indica que as Stanniocalcinas não participam da homeostasia mineral em condições fisiológicas, diferentemente do que ocorre em peixes (YEUNG et al., 2012). Porém, foi demonstrado que a hipertonicidade e o Ca^{2+} extracelular (SHEIKH-HAMAD et al., 2000; SAZONOVA et al., 2008), assim como a privação de água em mamíferos (TURNER et al., 2010) regulam a expressão de STC1 renal. A hipótese de uma relação funcional entre a STC1 e a regulação do Ca^{2+} intracelular foi reforçada em um estudo que demonstra a ação inibitória da STC1 em correntes de cálcio transmembrana de canais do tipo L em cardiomiócitos de ratos (SHEIKH-HAMAD et al., 2003) e em células Paju, uma linhagem de células tumorais derivadas da crista neural (ZHANG et al., 2000), apoiando a hipótese de que a STC1 possa estar envolvida na regulação de Ca^{2+} a nível celular e tecidual.

1.1.3.2. Diferenciação celular

A proteína STC1 é expressa em cardiomiócitos no coração de camundongos em desenvolvimento e em todos os estágios de diferenciação, desde os mioblastos até a formação dos miotubos no músculo esquelético em desenvolvimento (JIANG et al., 2000). Camundongos transgênicos superexpressando STC1, sob o controle do promotor da metalotioneína 1 ou da miosina de cadeia leve músculo-específica (MLC-hSTC1), apresentaram nanismo. O atraso no crescimento muscular e ósseo pode ser devido à aceleração da diferenciação e amadurecimento dos músculos e ossos provocados pela STC1 (FILVAROFF et al., 2002; VARGHESE et al., 2002). De forma semelhante, a STC1 humana recombinante (hrSTC1) acelera o desenvolvimento osteogênico em culturas celulares de calvaria fetal de ratos, enquanto oligonucleotídios antisense que inibem a expressão de *stc1* atrasam o desenvolvimento (YOSHIKO et al., 2003).

Células de vida curta ou com potencial proliferativo geralmente não expressam STC1. Chang e colaboradores (1995) não conseguiram detectar mRNA de STC1 no fígado, embora um alto nível de atividade de receptores é evidente em hepatócitos (MCCUDDEN et al., 2002). No entanto, células com capacidade proliferativa limitada expressam STC1, como os oócitos (DEOL et al., 2000), os osteoblastos (YOSHIKO et al., 2003), os condrócitos (YOSHIKO et al., 1999), os cardiomiócitos (SHEIKH-HAMAD et al., 2003), o músculo estriado (JIANG et al., 2000), e os neurônios (ZHANG et al., 2000; ZHANG et al., 1998).

Foi demonstrado ainda que fibroblastos maduros diminuem a expressão de STC1 após imortalização (CHANG et al., 1995). A expressão de STC1 também é diminuída em diversos tipos de câncer humanos (ISMAIL et al., 2000; WELCSH et

al., 2002), o que pode ser devido à capacidade proliferativa adquirida por essas células.

1.1.3.3. Metabolismo

Apesar da baixa expressão de STC1 no músculo esquelético, a STC1 é acumulada nesse tecido (DE NIU et al., 2000). Os músculos dos camundongos MLC-hSTC1 são menores, tanto em peso quanto em tamanho proporcional de massa corporal, do que os animais controle de mesma idade (FILVAROFF et al., 2002). Essa diferença pode ser devido a uma estimulação prematura da diferenciação muscular pela STC1, acelerando a formação do miotubo. Além disso, a musculatura esquelética desses animais apresentou um grande aumento no tamanho das mitocôndrias, e um ensaio de função muscular pela medida do perfil de contratilidade do músculo gastrocnêmico demonstrou que o músculo tinha uma habilidade debilitada de recuperação após ligação da artéria femoral (FILVAROFF et al., 2002).

Os animais MLC-hSTC1 também consumiam mais alimento e oxigênio e apresentavam depuração (*clearance*) de glicose mais rápida do que os controles de mesma idade. O estudo com esses animais transgênicos indica que a STC1 pode afetar a massa e a função muscular, em parte por regular o metabolismo muscular por meio de alterações na mitocôndria. Essa hipótese é reforçada pelo estudo de McCudden e colaboradores (2002), que identificou receptores de alta afinidade para STC1 na membrana mitocondrial interna. Ao analisar os efeitos de hrSTC1 em partículas mitocondriais, os autores também demonstraram que a STC1 apresenta efeito estimulatório sobre a cadeia transportadora de elétrons, o qual era

dependente da concentração da proteína. No entanto, ainda não está claro se a STC1 age como um aceptor de elétrons ou tem efeitos estimulatórios diretos na cadeia transportadora por meio de aprimoramento da atividade das enzimas da cadeia de elétrons.

Estudos também têm demonstrado que a STC1 induz a expressão de proteínas desacopladoras (UCPs) nas mitocôndrias. Em macrófagos, a indução de UCP2 pela STC1 provoca diminuição do potencial de membrana mitocondrial e da geração de superóxido (WANG et al., 2009). Em cardiomiócitos, a STC1 induz UCP3 (LIU et al., 2012); e, em fotorreceptores de ratos, aumenta a expressão de UCP2 (RODDY et al., 2012).

A STC1 está co-localizada com a insulina em células β de ilhotas pancreáticas em camundongos adultos (ZAIDI et al., 2012). Visto que o desacoplamento da cadeia respiratória é crítico para a liberação de insulina (HEART et al., 2006) e que a STC1 promove o desacoplamento respiratório em diversos tecidos, é possível que ela tenha efeitos regulatórios na secreção de insulina.

1.1.3.4. Câncer

O gene da *stc1* em mamíferos foi originalmente identificado e clonado em estudos relacionados com genes marcadores de câncer (CHANG et al., 1995). A STC1 possui alterações na sua expressão em diversos tipos de cânceres, quando comparado com o tecido saudável. O mRNA da STC1 está presente na medula óssea e células sanguíneas de pacientes com câncer de mama, enquanto não foi detectado mRNA da proteína em voluntários saudáveis (WASCHER et al., 2003). Os autores desse estudo sugerem o mRNA da STC1 como um biomarcador para câncer

de mama. Outros estudos também sugerem a detecção do mRNA de *stc1* em sangue periférico como biomarcador para câncer gástrico (ARIGAMI et al., 2012) e câncer de pulmão de células não pequenas (DU et al., 2011).

Além disso, foram detectados níveis elevados de mRNA de *stc1* na vasculatura de adenocarcinomas mamários e outros tumores (KAHN et al., 2000). Um aumento de até 10 vezes na expressão de *stc1* em tumores de cólon foi devido, primariamente, a expressão da proteína na vasculatura do tumor (GERRITSEN et al., 2002). Expressão aumentada de *stc1* foi relatada em mais de 75% de amostras de tumores de carcinomas hepatocelulares (OKABE et al., 2001), além de relatos de aumento de expressão de *STC1* e de *stc1* em câncer colorretal (TAMURA et al., 2011), câncer de ovário (LIU et al., 2010), carcinoma mamário (WASHER et al., 2003; MCCUDDEN et al., 2004; JOENSUU et al., 2008), e leucemia (TOHMIYA et al., 2004). No entanto, foi observada uma diminuição na expressão de *stc1* em câncer de mama e de ovário por Welch e colaboradores (2002).

O papel da *STC1* na carcinogênese ainda não está claro. Acredita-se que a vasculatura do tumor possa ser responsável pelo aumento na expressão de *STC1* (KAHN et al., 2000; GERRITSEN et al., 2002). O fato de que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) induz a expressão de *STC1* reforça essa suposição (WARY et al., 2003). O fator induzível pela hipóxia (HIF-1) é um regulador importante nas respostas celulares à privação de oxigênio e está envolvido na progressão do câncer (JIANG et al., 1997; MAXWELL et al., 1997; CARMELIET et al., 1998; RAVI et al., 2000; AKAKURA et al., 2001). O HIF-1 é um fator de transcrição que estimula a expressão de *STC1* em células de câncer humano, sugerindo um papel para a *STC1* no efeito Warburg induzido pela hipóxia (YEUNG et al., 2005). O efeito Warburg é a reprogramação do metabolismo tumoral de uma via oxidativa para uma

via mais glicolítica, no qual HIF-1 possui um papel central. Essa reprogramação é uma das características universais de tumores sólidos (CHANG et al., 2003). Visto que HIF-1 induz expressão tanto de STC1 (YEUNG et al., 2005) quanto de VEGF (FORSYTHE et al., 1996), e VEGF também induz expressão de STC1 (WARY et al., 2003), a STC1 parece estar envolvida na vascularização de tumor induzida pelo ambiente hipóxico. Além disso, considerando o papel descrito acima da STC1 no metabolismo, é possível supor que ela possa ter também algum papel no efeito Warburg.

1.1.3.5. Apoptose

Na literatura também são encontrados relatos sobre os efeitos pró ou anti-apoptóticos da STC1. Células humanas de câncer nasofaríngeal induzidas à apoptose aumentam a expressão de STC1 provocada pela proteína supressora de tumor p53 e estimuladora da apoptose (codificada pelo gene TP53) (LAI et al., 2007). Fibroblastos de embrião de camundongo (MEFs) apresentam um mecanismo de *feedback* negativo entre a STC1 e a via de sinalização ERK1/ERK2, a qual estimula a sobrevivência celular (NGUYEN et al., 2009). A via da ERK1/ERK2 aumenta a expressão de STC1, que, por sua vez, diminui os níveis de MEK ativada (e, conseqüentemente os níveis de ERK1/ERK2), reduzindo a ativação dessa via de sinalização e diminuindo a sobrevivência dessas MEFs (efeito pró-apoptótico) quando em condições de estresse oxidativo. A STC1 também apresenta efeito pró-apoptótico em culturas de condrócitos (WU et al., 2006), em células de câncer nasofaríngeal humano tratadas com iodoacetamina (LAI et al., 2007) e em células de câncer coloretal humano tratadas com tricostatina A (LAW et al., 2008).

Inversamente, em fibroblastos irradiados com luz ultravioleta e em células epiteliais de câncer pulmonar mantidas em condições apoptóticas (baixo pH em hipóxia), a STC1 reduziu a apoptose (efeito anti-apoptótico) (BLOCK et al., 2009), assim como teve efeito anti-apoptótico em células de câncer de ovário humano (LIU et al., 2010).

1.1.3.6. Sistema Nervoso Central

Em 1998, Zhang e colaboradores demonstraram aumento da expressão da STC1 em células Paju após indução da diferenciação neuronal com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). As células Paju são provenientes de fluido pleural de um paciente com neoplasia derivada da crista neural e o tratamento dessas células com PMA induz crescimento dendrítico e cessação da proliferação celular, mimetizando a diferenciação neuronal (ZHANG et al., 1998). Nesse estudo também foi observado aumento da expressão protéica de STC1 nas células induzidas a diferenciação, com marcação perinuclear de STC1. A proteína STC1 também foi observada em diferentes partes do encéfalo humano, estando presente em neurônios, células endoteliais de vasos sanguíneos e epitélio do plexo coroide, porém não foi detectada STC1 em estruturas gliais (ZHANG et al., 1998).

Foi analisada a expressão protéica de STC1 em encéfalo de camundongos no 15º dia de gestação, recém-nascidos e adultos. Foi observada uma fraca marcação de STC1 no tecido nervoso dos animais recém-nascidos e uma forte marcação para a proteína em animais adultos (ZHANG et al., 1998).

Células Paju que superexpressam STC1 demonstram resistência aumentada a tratamento com cloreto de cobalto (CoCl_2), o qual mimetiza hipóxia. Essas células

também foram mais resistentes ao tratamento com taspigargina, que inibe Ca^{2+} ATPases e libera cálcio de reservas intracelulares, resultando em concentração elevada de cálcio livre na célula (ZHANG et al., 2000). Hibridização *in situ* e imunohistoquímica demonstraram expressão elevada de STC1 em neurônios da penumbra de encéfalos com indução de infarto (ZHANG et al., 2000). Nesse mesmo estudo, também foi observado aumento da expressão de STC1 na penumbra ao redor da área de infarto de um paciente que faleceu após um infarto isquêmico, e os autores desse estudo concluíram que a STC1 seria neuroprotetora (ZHANG et al., 2000).

A STC1 apresenta um papel também no controle central da pressão arterial. Ciriello (2012) e colaboradores demonstraram sítios de ligação de STC1 e expressão da proteína em regiões do núcleo do trato solitário, e microinjeções de STC1 nessas regiões causavam mudanças na excitabilidade de neurônios que funcionam como componentes do reflexo barorreceptor, que regula a pressão arterial (CIRIELLO et al., 2012).

1.2. Isquemia cerebral

A isquemia cerebral é uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre adultos e idosos. Ela está intimamente relacionada a diversos fatores de risco como hipertensão, hipercolesterolemia e diabete (PRICE, 1999). O encéfalo é mais vulnerável ao dano isquêmico do que os outros tecidos por possuir uma alta taxa metabólica, baixos estoques de energia e alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose. Em humanos, o tipo mais freqüente de isquemia é a focal, a qual é definida como uma interrupção do fluxo sanguíneo para uma parte do tecido

cerebral. Outro tipo é a isquemia global, a qual resulta da interrupção transitória do fluxo sanguíneo para todo o encéfalo, como ocorre durante uma parada cardíaca (LIPTON, 1999). Além dos danos causados pela falta de oxigênio e metabólitos durante a isquemia, a volta da circulação sanguínea causa aumento de espécies reativas do oxigênio, o que pode levar à morte celular (SIEGEL et al., 1999).

Durante a isquemia, a diminuição de oxigênio (hipóxia) e de glicose causa diminuição da produção de ATP, o que prejudica a atividade de trocadores iônicos como, por exemplo, a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Isso resulta em uma despolarização das membranas celulares, levando à liberação e acúmulo de neurotransmissores excitatórios no espaço extracelular, como o glutamato (DIRNAGL et al., 1999). O glutamato causa despolarização ainda maior das membranas neuronais, o que leva à entrada de cálcio para as células e seu acúmulo. O cálcio, por sua vez, causa ativação de proteases, aumento da produção de radicais livres pela mitocôndria, além de ativação da óxido nítrico sintase, o que contribui ainda mais para o aumento de estresse oxidativo na célula (DIRNAGL et al., 1999; JUURLINK & SWEENEY, 1997).

Independentemente do tipo de isquemia (focal ou global), ocorre disfunção ou perda de células cerebrais (NAKKA et al., 2008). A morte celular, nesse caso, pode ser por necrose, apoptose ou ambas. A intensidade do dano causado é dependente do tempo de duração e do tipo de isquemia: um curto período de isquemia global causa morte celular por apoptose horas ou até dias após a lesão, enquanto que a isquemia focal causa morte por necrose (NAKKA et al., 2008; ROSENBLUM, 1997). Além disso, populações distintas de neurônios apresentam diferentes vulnerabilidades à isquemia, e células gliais apresentam uma resistência maior a esse tipo de lesão (NIKONENKO et al., 2009).

1.2.1. Modelo experimental de isquemia

Existem diversos modelos utilizados para o estudo dos efeitos da isquemia, entre os quais se encontra o modelo *in vitro* de culturas organotípicas submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG). O modelo de cultura organotípica foi desenvolvido em 1984 por Gähwiler e modificado por Stoppini e colaboradores em 1991. Trata-se de um método que mantém as fatias de um determinado tecido em cultivo, em uma interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo o tecido ser mantido nessas condições por diversas semanas.

Uma das vantagens das culturas organotípicas é a manutenção da organização tecidual tal como ocorre *in vivo* (STOPPINI et al., 1991; GÄHWILER et al., 1997). Por reproduzirem muitos aspectos da isquemia *in vivo*, tais como a morte neuronal tardia e a vulnerabilidade seletiva (STRASSER & FISCHER, 1995; LAAKE et al., 1999; HORN et al., 2005), as culturas organotípicas de fatias hipocampais são uma excelente alternativa para o estudo dos mecanismos associados à isquemia cerebral.

1.3. Neuroblastoma

O neuroblastoma é um tumor pediátrico sólido extracranial, que pode aparecer desde o nascimento até a infância inicial, com casos raros diagnosticados após os 10 anos de idade. Os neuroblastomas são clinicamente classificados em 5 estágios, desde o estágio 1 que apresenta tumores localizados até o estágio 4 que apresenta tumores extensamente disseminados. Crianças com os estágios 1 e 2 são

tratadas apenas com cirurgia, enquanto crianças com estágio 4 recebem tratamentos com radiação e quimioterapia. Alguns tumores estão inseridos na categoria 4s, que é caracterizada por tumores primários localizados e disseminação limitada ao fígado, pele e/ou medula óssea. Os tumores podem regredir espontaneamente e, apesar da disseminação extensa do tumor, a taxa de sobrevivência de pacientes do estágio 4s é aproximadamente 80%, contrastando com a taxa de sobrevivência próxima de 20% em pacientes com neuroblastoma estágio 4 (BRODEUR et al., 1993).

As células de neuroblastoma surgem a partir de células neoplásicas imaturas da crista neural que possuem propriedades de células-tronco (ROSS et al., 1995; HOGARTY, 2003). Elas também possuem propensão à diferenciação e agentes farmacológicos podem induzir a regressão do neuroblastoma. O ácido retinóico (RA) é utilizado clinicamente por sua habilidade de induzir diferenciação celular (HANSEN et al., 2000). O RA, que é a forma biologicamente ativa da vitamina A, é um morfógeno natural que participa do desenvolvimento embrionário inicial e da diferenciação do sistema nervoso (DUESTER, 2008). O RA pode também inibir o crescimento de células malignas por induzir parada do ciclo celular, diferenciação e apoptose (NOY, 2010).

1.3.1. Linhagem SH-SY5Y

A linhagem celular SH-SY5Y é uma sublinhagem clonada a partir de células SK-N-SH, originalmente estabelecidas de uma biópsia de medula óssea de um paciente com neuroblastoma de origem ganglial simpato-adrenérgica na década de 70 (BIEDLER et al., 1973). A linhagem celular SH-SY5Y apresenta atividade de

enzimas marcadoras neuronais (tirosina hidroxilase e dopamina- β -hidroxilase), captação de noraepinefrina, expressa uma ou mais proteínas de neurofilamentos e receptores opióides, muscarínicos e fator de crescimento do nervo (CICCARONE et al., 1989). As SH-SY5Y possuem a capacidade de proliferar em cultura por longos períodos e podem ser induzidas à diferenciação por diversos agentes, incluindo RA (SINGH et al., 2007), forbol ester 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (PAHLMAN et al., 1981), fator neurotrófico derivado do cérebro (CERNAIANU et al., 2008), dibutilil AMP cíclico (dbcAMP) (KUME et al., 2008), purina (GUARNIERI et al., 2009) ou estaurosporina (MOLLEREAU et al., 2007).

A diferenciação das células SH-SY5Y com RA modifica sua morfologia e promove o desenvolvimento de neuritos e expressão de diversos marcadores neuronais (CICCARONE et al., 1989; KAUR & SINGH, 2007; HU et al., 2010). A diferenciação neuronal induzida por RA também aumenta a taxa de consumo de oxigênio, potencializa a capacidade respiratória de reserva mitocondrial e aumenta o potencial de membrana mitocondrial, sem aumentar a quantidade de mitocôndrias, demonstrando uma preferência dessas células diferenciadas pela fosforilação oxidativa para a obtenção de ATP, ao passo que as células indiferenciadas adaptam seu metabolismo de acordo com as condições do meio (SCHNEIDER et al., 2011; XUN et al., 2012). Como consequência, a linhagem celular SH-SY5Y tem sido utilizada em diversos estudos experimentais, incluindo análise de diferenciação neuronal, metabolismo, processos neurodegenerativos, neurotoxicidade e neuroproteção (XIE et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi analisar a distribuição celular da Stanniocalcina 1 em hipocampos de ratos em diferentes idades e avaliar os efeitos da Stanniocalcina 1 humana recombinante na viabilidade de culturas organotípicas de hipocampo e em células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar e analisar a distribuição celular de STC1 no hipocampo de ratos jovens e adultos;
- Avaliar se a STC1 possui efeitos citoprotetores em culturas organotípicas de hipocampo de rato submetidas à privação de oxigênio e glicose;
- Analisar a viabilidade de células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas em neurônios após a administração de STC1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar machos foram obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica. Os animais eram mantidos em condição padrão de biotério, em ciclo claro/escuro (12h/12h). Para a obtenção dos encéfalos para a imunohistoquímica e para a dissecação dos hipocampos para a cultura organotípica os animais foram decapitados. Todos os procedimentos utilizados seguiram os princípios de “Cuidados com Animais de Laboratório” do Instituto Nacional de Saúde (National Institute of Health – NIH) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2. Imunohistoquímica

Para a técnica de imunohistoquímica foram utilizados 9 ratos de três idades diferentes: 8 dias, 20 dias e 60 dias. Os encéfalos foram dissecados e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas e, após, crioprotetidos em solução de sacarose 15% e 30% em tampão fosfato salino (PBS) a 4°C. O tecido foi colocado em meio de inclusão para criostato (Killik, EasyPath, Brasil) e foram feitas fatias coronais seriadas de 50 µm em criostato (Leitz Biosystems, Wetzlar, Alemanha). As fatias foram coletadas em lâminas gelatinizadas e foram permeabilizadas com 0,25% de Triton X-100 em PBS por 10 minutos. Os anticorpos primários anti-STC1 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, USA) e anti-NeuN (1:750; Cell Signaling Technology, USA) foram diluídos em solução bloqueadora (0,25% triton X-100, 5% soro de cabra

e 0,05% de azida sódica) a qual foi aplicada nas fatias overnight, a 4°C. A incubação com anticorpos secundários Alexa Fluor 488 (1:1000) ou 568 (1:400) (Life Technologies, Invitrogen, USA) diluídos na solução bloqueadora foi realizada a temperatura ambiente por 1 hora. Como controle negativo, o anticorpo primário não foi utilizado em algumas fatias. Não foi observada reatividade no controle negativo. Para os tecidos de animais de 8 e de 60 dias foi utilizado o corante Hoechst 33342 para marcação de núcleos celulares por 15 minutos a temperatura ambiente. As fatias foram colocadas em solução de montagem (Life Technologies, Invitrogen, USA) e cobertas com lamínulas de vidro. As lâminas foram analisadas em microscópio confocal (Olympus, USA). As imagens capturadas foram processadas com o software ImageJ (com pacote de plug-ins da MacBiophotonics, McMaster University, Ontario, Canadá).

3.3. Cultura organotípica de hipocampo

3.3.1. Procedimento de cultivo

A cultura organotípica de hipocampo foi realizada de acordo com o método descrito por Stoppini e colaboradores (1991). Os hipocampos de 9 ratos *Wistar* machos de 6-8 dias foram fatiados em 400 µm por meio de um fatiador de tecido McIlwain chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Surrey, Reino Unido), que foram separadas em Hank's balanced salt solution (HBSS) composto por: glicose 36 mM, CaCl₂ 1,26 mM, KCl 5,36 mM, NaCl 136,89 mM, KH₂HPO₄ 0,44 mM, Na₂HPO₄ 0,34 mM, MgCl₂ 0,49 mM, MgSO₄ 0,44 mM, HEPES 25 mM, fungizona 1% e gentamicina 0,100 mg/mL, pH 7,2. As fatias foram colocadas em insertes para

cultura Millicell (Millipore, Billerica, MA, EUA) e transferidas para uma placa de cultura de 6 poços. As culturas foram cultivadas por 14 dias em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e mantidas em 50% MEM, 25% HBSS e 25% soro eqüino, suplementado com HEPES 25 mM, NaHCO₃ 4 mM, glicose 36 mM, 1% fungizona e gentamicina 0,100 mg/mL, pH 7,3. As trocas de meio foram realizadas 2 vezes por semana.

3.3.2. Privação de Oxigênio e Glicose

A exposição das culturas à privação de oxigênio e glicose (POG) foi feita de acordo com o método de Strasser e Fischer (1995), com modificações (Zamin et al., 2006). Ao final de 14 dias de cultivo, os insertes das culturas foram transferidos para uma placa contendo meio sem glicose (meio de POG). Após, o meio foi trocado por outro com a mesma composição e previamente borbulhado com N₂ por 30 minutos. A placa foi colocada em uma câmara anaeróbica a 37°C, por 60 minutos. As fatias controle foram mantidas em meio de cultivo completo na incubadora com atmosfera 5% CO₂ a 37°C. Após esse período, as culturas foram tratadas com STC1 em meio de cultivo por 24 horas.

3.3.3. Tratamento com stanniocalcina 1

A Stanniocalcina 1 humana recombinante (hrSTC1) foi obtida da BioVendor Research and Diagnostic Products (Life-Sciences, Brasil) e dissolvida em água deionizada na concentração 0,1 mg/mL. Para as culturas organotípicas de hipocampo, a STC1 foi adicionada ao meio de cultivo após a POG e o tratamento foi

mantido por 24 horas, nas concentrações de 0,1 ng/mL e 1 ng/mL. Foram utilizados grupos POG tratados com STC1 e grupos que não foram submetidos à POG, mas foram tratados com STC1 (controle STC1).

3.3.4. Quantificação da morte celular

A intensidade de morte celular foi analisada pela avaliação da incorporação do corante iodeto de propídio (IP). Após o período de recuperação por 24 horas, 5 μ M de IP foram adicionados às culturas e incubados por 60 minutos. As culturas foram observadas em microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE 300) e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera CCD (DXM1200C Nikon Instruments Inc., USA) e analisadas por meio do software ImageJ (com pacote de plug-ins da MacBiophotonics, McMaster University, Ontario, Canadá). A porcentagem de morte celular foi calculada pela razão entre a área da figura marcada com IP pela área total do hipocampo.

3.4. Células de neuroblastoma

3.4.1. Cultivo de células SH-SY5Y

A linhagem celular SH-SY5Y foi gentilmente doada pela Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade, que adquiriu as células do Banco de Células do Rio de Janeiro, Associação Técnico Científica Paul Ehrlich. As células foram utilizadas até a 20^a passagem e foram mantidas em Dulbecco's Modified Eagle Medium suplementado com meio F12 (DMEM/F12, Gibco[®], Life Technologies[™], USA), com

10% de soro fetal bovino (SFB, Cripion Biotecnologia Ltda., Andradina, SP, Brasil), em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. As células foram semeadas em diferentes densidades, de acordo com o experimento a ser realizado (Tabela 1). Vinte e quatro horas após as células serem semeadas, a diferenciação neuronal foi induzida pela redução do SFB a 1% no meio de cultivo e adição de 10 µM de ácido all-trans-retinóico (atAR; Enzo Life Sciences, USA). As células diferenciadas foram utilizadas nos experimentos entre o 7º e o 10º dia de diferenciação, com trocas de meio a cada dois dias.

Tabela 1 – Quantidade de células semeadas por experimento.

Área de cultivo (cm ²)	Quantidade células	Experimento
0,34	5 x 10 ⁴	Marcação IP e Hoechst q-RT-PCR Western-blotting
3,9	3,8 x 10 ⁵	
25	3 x 10 ⁶	

3.4.2. Tratamento com Stanniocalcina 1

A hrSTC1 foi adicionada ao meio de cultivo nas células indiferenciadas 24 horas após elas serem semeadas e, nas células diferenciadas, entre o 7º e o 10º dia de diferenciação. Foram utilizadas as concentrações de 0,1, 1, 10, 25 e 50 ng/mL de STC1, durante 3 horas, para a técnica de marcação com IP e com o corante nuclear Hoechst. Para o Western-blotting e o q-RT-PCR, foi utilizada a concentração de 25 ng/mL, também durante 3 horas.

3.4.3. Quantificação da morte celular

A quantificação da morte celular foi realizada por meio da marcação das células com o corante IP e o corante Hoechst 33342 (Molecular Probes™, Invitrogen™). Após o tratamento com STC1, 5 µM de IP e 5 µg/mL de Hoechst 33342 foram adicionados às culturas e incubados por 15 minutos. As culturas foram observadas em microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE 300) e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera CCD (DXM1200C Nikon Instruments Inc., USA) e analisadas por meio do software ImageJ (com pacote de plug-ins da MacBiophotonics, McMaster University, Ontario, Canadá). As imagens obtidas das células marcadas com IP e Hoechst foram sobrepostas. Foi determinado um threshold que englobava a área com todos os núcleos marcados (área total) e uma área com os núcleos que apresentavam maior intensidade de marcação (área de morte). O corante Hoechst 33342 apresenta maior intensidade de marcação quando a cromatina está condensada, como no caso de apoptose. Assim, juntamente com a marcação com IP, foi possível obter a área de morte por meio da seleção do threshold que englobava as células com maior intensidade de marcação.

3.4.4. Detecção da proteína Caspase 3 por Western-blotting

As células foram homogeneizadas em tampão de Laemmli e o β-mercaptoetanol foi adicionado a uma concentração final de 5%. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE, em gel com 15% de acrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas por 120 min a 4°C em tampão de bloqueio com 5% de leite em pó desnatado e incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário dissolvido em tampão de bloqueio. Foram utilizados anticorpos primários anti-Caspase3 (1:400;

Cell Signaling Technology), e anti- β -actina (1:1000; Cell Signaling Technology) como proteína constitutiva. As membranas foram então incubadas com IgG anti-rabbit conjugado com peroxidase (1:1000; BioRad) por 2 h a temperatura ambiente. A quimiluminescência foi obtida por reação com luminol (ECL, PerkinElmer) e detectada em filmes raios-x (Kodak T-Mat).

3.4.5. Expressão gênica de *stc1* e de *caspase3* por q-RT-PCR

O RNA total das células SH-SY5Y foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, USA) segundo o protocolo do fabricante. Após a extração, o RNA total foi quantificado por absorbância UV no aparelho BioPhotometer Plus (Eppendorf, USA) e sua integridade foi analisada em gel de agarose 1%. A transcrição reversa foi realizada com o kit SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA), a partir de 3 μ g de RNA para todas as amostras, utilizando-se oligonucleotídeos OligoDT, conforme orientações do fabricante. O cDNA sintetizado foi utilizado para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-RT-PCR). O q-RT-PCR foi realizado com o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Brasil) em termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Brasil), em um volume final de 25 μ L, contendo 0,2 μ M de cada primer específico e 1 μ L de cDNA na diluição 1:10. As sequências de primers utilizadas foram desenhadas com o software IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc., USA) utilizando-se sequências gênicas disponíveis no site do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e no site de genomas Ensembl (www.ensembl.org).

As sequências dos primers da *stc1* humana (número de acesso NCBI: NM_003155) foram desenhadas entre o exon1 e o exon2: *stc1* forward (5'-

GAGAATGCTCCAAAACACTCAGC-3'), *stc1* reverse (5'-AGGCAACGAACCACTTCAG-3'). Os primers para caspase3 de rato (número de acesso NCBI: NM_012922) foram desenhados entre os exons 5 e 7: *casp3* forward (5'-AGATCACAGCAAAAAGGAGCAG-3'), *casp3* reverse (5'-CAATACCGCAGTCCAGCTC-3'). O gene constitutivo utilizado para a normalização das reações foi o TBP humano (número de acesso no NCBI: NM_003194) TBP forward (5'-GGGTTTTCCAGCTAAGTTCTTG-3') e TBP reverse (5'-CAGGAAATAACTCTGGCTCATAAC-3'). As condições de ciclos foram: 95°C por 120 s, seguido de 40 ciclos em 95°C por 15 s e 60°C por 30 s.

Ao final da reação de PCR, foi realizada a curva de *melting* para confirmação da presença do *amplicon* específico esperado para cada par de primer utilizado e para a verificação da possível formação de dímeros entre primers. As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra de cDNA sintetizado. Como controle negativo foi utilizada uma alíquota de água no lugar do cDNA. As reações contendo cDNA amplificaram somente os amplicons esperados e as amostras de controle negativo não amplificaram nenhum amplicon, demonstrando a qualidade das reações. Os valores das médias de Ct (cycle threshold) das amostras em triplicatas foram usadas para calcular a expressão do gene alvo, normalizando-se os resultados pelo gene constitutivo e utilizando a fórmula do $2^{-\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

3.4.6. Quantificação protéica

Foi utilizado o kit Pierce BCA Protein Assay da Thermo Scientific, o qual é uma formulação compatível com detergente, baseado na técnica do ácido bicinconínico (BCA), para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total.

3.5. Análise Estatística

Os dados são expressos como média+EP. Os dados foram avaliados por regressão linear, ANOVA de duas vias (utilizando diferenciação e stanniocalcina 1 como variáveis independentes) seguido do teste de Duncan e teste *t* não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism 5 (versão 5.02).

5. DISCUSSÃO

Até o momento, nenhum estudo demonstrou a distribuição da proteína STC1 no hipocampo de ratos. Zhang e colaboradores (1998) mostraram a distribuição de STC1 no encéfalo de humanos e de camundongos no 15º dia de gestação, recém-nascidos e adultos. Os autores observaram intensa ir-STC1 em neurônios corticais e no cerebelo, nas células de Purkinje e em neurônios maiores do núcleo denteado, no encéfalo humano. A STC1 nessas regiões aparecia com marcação perinuclear e não foi observada marcação em células gliais, nem em axônios ou dendritos. Em camundongos, não foi observada marcação para STC1 nos embriões, mas foi detectada imunorreatividade fraca em animais recém-nascidos. Em animais adultos, entretanto, foi detectada forte ir-STC1 em neurônios corticais e cerebelares.

No presente estudo, observamos forte ir-STC1 nos hipocampos de ratos com 6, 21 e 60 dias de idade. No hipocampo desses animais é observada marcação neuronal perinuclear, mas também observamos ir-STC1 em todas as regiões hipocampais. Pela marcação com Hoechst é possível observar ir-STC1 perinuclear em regiões que contém células gliais. Outra observação interessante é que a distribuição da ir-STC1 é homogêna, podendo-se afirmar que a proteína está presente em neurônios e interneurônios, devido à imunorreatividade perinuclear no hilo, principalmente de células marcadas com NeuN nos ratos de 21 dias, região que apresenta proporção 1:1 entre neurônios e interneurônios (VIDA, 2010). Isso significa que, no hipocampo, a STC1 está distribuída tanto em neurônios glutamatérgicos quanto GABAérgicos.

Surpreendentemente, os animais com 21 dias de idade apresentavam distribuição de STC1 diferente do observado em animais de 6 e 60 dias. As

alterações provocadas no sistema nervoso central por alterações em hormônios esteróides são bastante conhecidas (MCEWEN, 1994; OZAWA, 2005), embora alterações hipocampais sexo- e tempo-dependentes sejam desconhecidas (MITSUSHIMA, 2011). O fato de haver alterações de distribuição da STC1 no hipocampo de ratos machos com 21 dias de idade, que é um período em que ocorrem alterações hormonais no animal, pode ser um indicativo de que a expressão da STC1 pode ser regulada por hormônios, ou de que as alterações neuronais que ocorrem nessa idade afetam a distribuição e possivelmente a função da STC1 no hipocampo.

As células Paju são uma linhagem de neuroblastoma estabelecida de metástases pleurais de um paciente (ZHANG et al., 1998) e essas células podem ser diferenciadas para fenótipo neuronal por diversos estímulos, como PMA (ZHANG et al., 1998), atAR (HEGYESI et al., 2004), interferon-gamma (SONG et al., 2005). Zhang e colaboradores (2000) superexpressaram STC1 nas células Paju e observaram que as células tinham uma resistência maior ao tratamento com CoCl_2 , o qual mimetiza hipóxia e provoca entrada de cálcio nas células (YAMAGAMI et al., 1994). Essas células também demonstraram resistência aumentada à mobilização de cálcio intracelular provocado por tratamento com taspigargina (ZHANG et al., 2000). A partir das observações dos efeitos da superexpressão de STC1 nas células Paju e do aumento da expressão de STC1 no encéfalo de ratos submetidos à isquemia, Zhang e colaboradores sugeriram que a STC1 é neuroprotetora. No entanto, as análises feitas no estudo foram em células Paju no estado indiferenciado, e em nenhum momento os autores testaram os efeitos da STC1 nas células diferenciadas.

No presente estudo, ao analisarmos os efeitos da STC1 em células de neuroblastoma SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas com atAR, nós observamos diferenças nos efeitos da STC1 entre os dois fenótipos celulares, sendo que a STC1 provocou a morte por apoptose das células diferenciadas, enquanto que não foi observada morte nas células indiferenciadas. Demonstramos também que a STC1 não confere neuroproteção após POG. Pelo contrário: ela induz morte celular em culturas organotípicas de hipocampo. O fato de que foi observado aumento da expressão de *Stc1* em encéfalos de ratos submetidos à isquemia cerebral focal (ZHANG et al., 2000) não é um indício de que a STC1 é neuroprotetora. Westberg e colaboradores (2007) observaram aumento da expressão de STC1 no encéfalo após pré-condicionamento à hipóxia. Entretanto, um estudo mais recente do mesmo grupo, utilizando camundongos KO para STC1, demonstrou que ela não é importante para a tolerância isquêmica (DURUKAN TOLVANEN et al., 2013).

A STC1 é considerada uma proteína pleiotrópica que exerce efeitos diversos em diferentes tipos celulares de mamíferos (Yoshiko et al., 2004). Ela apresenta diversos efeitos envolvendo regulação celular de cálcio tanto em tecidos de mamíferos (STASKO e WAGNER, 2001; WAGNER e DIMATTIA, 2006; Block et al., 2010) como em tecidos de peixes (WAGNER et al., 1986; WAGNER e JAWORSKI, 1994; TSENG et al., 2009; SCHEIN et al., 2012).

Alguns estudos na literatura mostram os efeitos da STC1 na indução de UCPs (WANG et al., 2009; LIU et al., 2012; RODDY et al., 2012) nas mitocôndrias, além da presença de sítios de ligação de alta afinidade na membrana mitocondrial interna (MCCUDDEN et al., 2002) e de seus efeitos como pró- ou anti-apoptótica (LAI et al., 2007; BLOCK et al., 2009; NGUYEN et al., 2009; LIU et al., 2010). Esses resultados corroboram fortemente o fato de que um dos principais alvos da STC1 é a

mitocôndria. E de fato, esta proteína já foi descrita como um hormônio de ação intrácrina, cujos alvos intracelulares principais seriam as mitocôndrias, o retículo endoplasmático, e as gotas lipídicas (RE & COOK, 2010). Outros indícios de possíveis mecanismos de ação da STC1 no metabolismo por meio de alterações mitocondriais são que animais MLC-hSTC1, que superexpressam STC1, apresentam depuração de glicose mais rápida e consomem mais alimento e oxigênio (FILVAROFF et al., 2002). Além disso, sabe-se que existe uma co-localização entre a STC1 e a insulina em células β em ilhotas pancreáticas (ZAIDI et al., 2012). A depuração acelerada de glicose e o aumento do consumo de oxigênio nos animais MLC-hSTC1 pode ser devido a um desacoplamento da cadeia respiratória, o que pode levar a uma necessidade maior de oxigênio, com menor produção de ATP e, conseqüentemente, a célula necessita de mais glicose para manter a demanda de ATP.

Em células SH-SY5Y, a diferenciação neuronal induzida por atAR promove alterações metabólicas nas células, sendo que as células indiferenciadas apresentam metabolismo adaptável em relação às condições do meio, ao passo que as células diferenciadas preferem a fosforilação oxidativa para a obtenção de ATP (SCHNEIDER et al., 2011; XUN et al., 2012). Essas diferenças metabólicas podem explicar a diferença na indução de morte por STC1 que observamos nesses dois fenótipos das células SH-SY5Y. Se a STC1 estiver causando desacoplamento da cadeia respiratória em neurônios, como ocorre em outros tipos celulares (WANG et al., 2009; SHEIKH-HAMAD, 2010; LIU et al., 2012), e se este desacoplamento provocar diminuição na síntese de ATP pela fosforilação oxidativa, é possível explicar as diferenças que observamos no presente estudo. As células diferenciadas, como são dependentes da fosforilação oxidativa para produção de

ATP, não conseguiriam suprir a demanda de ATP apenas com a via glicolítica e acabariam ativando a apoptose. As células indiferenciadas, como possuem um metabolismo adaptável, utilizariam preferencialmente a via glicolítica para suprir a demanda de ATP nessas condições e sobreviveriam ao tratamento com STC1. Além disso, nas células SH-SY5Y indiferenciadas, a expressão basal da *stc1* é aproximadamente 50% menor do que nas células diferenciadas, e o próprio tratamento com STC1 por 3h não altera significativamente este perfil de expressão gênica. Os dados obtidos para a expressão basal de *stc1* nas células indiferenciadas corroboram com o fato de que havendo menos STC1 endógena nas células, cujo alvo principal são as mitocôndrias, menos desacoplamento estaria ocorrendo, tornando estas células em seu estado basal mais resistentes aos efeitos da STC1 exógena, o que não aconteceria nas células diferenciadas, que expressam mais *stc1*, e que talvez estejam já mais sensíveis aos seus efeitos.

Os dados de expressão gênica obtidos estão de acordo com dados de CHANG e colaboradores (1995) e de ZHANG e colaboradores (1998), que mostraram que a *stc1* normalmente apresenta pouca ou nenhuma expressão em células proliferativas. Os resultados obtidos também estão de acordo com os resultados de WONG e colaboradores (2002), que mostraram que a linhagem celular de neuroblastoma Neuro-2A apresenta nenhuma, ou uma indetectável, expressão de *stc1* em células indiferenciadas. Já a expressão do mRNA aumenta com a diferenciação com dibutilil cAMP (WONG et al., 2002).

A estaurosporina, em baixas concentrações (na faixa de nM), induz diferenciação neuronal nas células SH-SY5Y (MOLLEREAU et al., 2007). Entretanto, na literatura está descrito o uso de diferentes concentrações e tempos de tratamento com estaurosporina para indução de apoptose nessas células (EMANUELSSON &

NORLIN, 2012; MORALEZ-HERNÁNDEZ et al., 2012; SHAH et al., 2013). No presente estudo foi utilizada a dose de 1 μ M (a qual foi escolhida com base nas indicações do fabricante) e 1 hora de incubação, o que não foi suficiente para ativação de caspase 3. Também não foi constatada a clivagem de caspase 3 em células SH-SY5Y indiferenciadas ou diferenciadas que não foram tratadas com STC1. Em relação à expressão de *casp3* não observamos diferenças nos níveis do mRNA com o tratamento de 25ng/ml de STC1 por 3 horas, sugerindo que o tratamento das células com STC1 não tem efeito sobre a indução deste gene.

Estudos tem demonstrado um papel não-apoptótico das caspases em relação a proliferação, migração, diferenciação e imunidade (revisado em MIURA, 2002). Dessa forma, é possível que a clivagem de caspase 3 que observamos nas células indiferenciadas não esteja relacionada com morte celular, mas com alguma alteração na sinalização das células provocada por STC1. Para confirmar se essa ativação de caspase 3 está relacionada ou não com a apoptose, seria necessário submeter as células indiferenciadas a um maior tempo de tratamento e avaliar se há morte celular.

Como descrito acima, existe inconsistência na descrição dos efeitos da STC1 sobre a apoptose. Mas essa inconsistência pode não ser contraditória. O fator de transcrição NF- κ B também apresenta ação pró- ou anti-inflamatória. O efeito de NF- κ B sobre a apoptose é dependente das vias de sinalização que ativam esse fator. Como muitas vias convergem no estado de ativação de NF- κ B, o que vai determinar o destino da célula são os genes que serão induzidos por esse fator e a maneira como eles são induzidos, ou seja, com atividade persistente ou intermitente (FOO & NOLAN, 1999; FAN et al., 2008). Dessa forma, é possível supor que a diferença observada no tratamento com STC1 de células SH-SY5Y indiferenciadas e

diferenciadas possa ser devido a diferentes perfis de sinalização em cada célula. Além disso, foi descrito que a STC1 está envolvida em um mecanismo de feedback negativo com a via de sinalização da MEK/ERK 1/2 (NGUYEN et al., 2009). A princípio, a diminuição da ativação de MEK induzida por STC1 poderia ter efeitos pró-apoptóticos. No entanto, estudos têm demonstrado que a via da ERK 1/2 pode ter efeitos pró-apoptóticos em neurônios, dependendo da magnitude e da duração da ativação da via (SUBRAMANIAM & UNSICKER, 2010). São necessários mais estudos para esclarecer os efeitos da STC1 e da via ERK 1/2 na indução de apoptose neuronal.

Sumarizando, os resultados obtidos mostraram a distribuição celular de STC1 no hipocampo de ratos jovens e adultos, sendo que ratos com 21 dias de idade apresentam distribuição de STC1 diferente da dos animais com 6 e 60 dias de idade. Além disso, demonstramos nesse estudo os efeitos citotóxicos da STC1 sobre células neuronais submetidas ou não a eventos isquêmicos, bem como seus efeitos letais sobre células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios pela ativação da via apoptótica. E, em células SH-SY5Y indiferenciadas, demonstramos que há clivagem de caspase 3 após tratamento com STC1, porém não foi observada morte dessas células após o tratamento. Os resultados do presente estudo indicam um possível papel da STC1 no desenvolvimento hipocampal em ratos jovens e demonstram que a STC1 apresenta efeitos neurotóxicos, e não neuroprotetores como descrito na literatura.

6. CONCLUSÕES

- A STC1 é expressa no hipocampo de ratos com idades de 6, 21, e 60 dias. A distribuição celular da STC1 nos animais de 6 e 60 dias de vida é predominantemente perinuclear, ao contrário do que é observado em ratos de 21 dias, que apresentam distribuição predominante em processos celulares, com menor marcação perinuclear;
- A STC1 não confere neuroproteção isquêmica em culturas organotípicas de hipocampo submetidas à POG;
- A STC1 em baixas concentrações é neurotóxica em culturas organotípicas de hipocampo;
- Em células SH-SY5Y diferenciadas, a STC1 também possui efeito neurotóxico e esse efeito é dependente da concentração;
- Em células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas a STC1 provoca clivagem de Caspase 3. Em células diferenciadas a STC1 causa, portanto, apoptose;
- Nas células indiferenciadas não foi possível afirmar se a ativação de Caspase 3 está relacionada com apoptose;
- A diferenciação com atRA aumenta a expressão de *stc1*.

- O tratamento com STC1 em células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas não aumenta a expressão de *stc1* ou de *casp3*.

Em resumo, este trabalho contribui para o entendimento das ações da Stanniocalcina 1 no sistema nervoso central e sugere novas hipóteses de estudo sobre os mecanismos de ação celular da Stanniocalcina 1.

7. PERSPECTIVAS

- Aumentar o tempo de exposição das células indiferenciadas à STC1 para confirmar se os níveis aumentados de caspase 3 clivada estão relacionados com indução de apoptose.
- Verificar os efeitos da STC1 sobre vias de sinalização de apoptose e sobrevivência celular nas células diferenciadas e indiferenciadas;
- Analisar os efeitos da STC1 sobre o metabolismo energético de células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas, sob o aspecto de metabólitos secretados e captados pelas células, atividade de transportadores relacionados ao metabolismo e atividade de enzimas-chave do metabolismo celular;
- Analisar os efeitos da STC1 sobre parâmetros mitocondriais em células SH-SY5Y indiferenciadas e diferenciadas, como a atividade respiratória mitocondrial, expressão de UCPs, expressão de componentes da cadeia transportadora de elétrons, entre outros;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAKURA N., et al. (2001) Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* **61**: 6548-6554
- ARIGAMI T., et al. (2012) Expression of stanniocalcin 1 as a potential biomarker of gastric cancer. *Oncology*, v. 83(3), p. 158-164
- BIEDLER J.L., et al. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33: 2643-2652.
- BLOCK, G.J., et al. (2009) Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells* 27, 670–681.
- BLOCK, G.J., et al. (2010) Stanniocalcin-1 Regulates Extracellular ATP-Induced Calcium Waves in Human Epithelial Cancer Cells by Stimulating ATP Release from Bystander Cells. *PLoS ONE* **5**(4): e10237.
- BRODEUR G.M., et al. (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*;11:1466–77.
- CARMELIET P., et al. (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**: 485-490
- CERNAIANU G., et al. (2008) All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *J Pediatr Surg*; 43: 1284-1294.
- CHANG A.C. & REDDEL R.R. (1998) Identification of a second stanniocalcin cDNA in mouse and human: stanniocalcin 2. *Mol Cell Endocrinol* **141**: 95-99
- CHANG A.C., et al. (1996) Molecular cloning and characterization of mouse stanniocalcin cDNA. *Mol Cell Endocrinol* **124**: 185-187
- CHANG, A.C., et al. (1995). A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. *Mol. Cell Endocrinol.* 112, 241–247.
- CICCARONE V., et al. (1989) Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res*; 49: 219-225.
- CIRIELLO J., et al. (2012) Effects of the calcium-regulating glycoprotein hormone stanniocalcin-1 within the nucleus of the solitary tract on arterial pressure and the baroreceptor reflex. *Neuroscience*, v. 207, p. 88-102. 2012.
- DE NIU P., et al. (2000) Development of a human stanniocalcin radioimmunoassay: serum and tissue hormone levels and pharmacokinetics in the rat. *Mol Cell Endocrinol* **162**: 131-144

- DEOL H.K., et al. (2000) Dynamic regulation of mouse ovarian stanniocalcin expression during gestation and lactation. *Endocrinology* **141**: 3412-3421
- DIMATTIA G.E., et al. (1998) Molecular cloning and characterization of stanniocalcin-related protein. *Mol Cell Endocrinol* **146**: 137-140
- DIRNAGL U., et al. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**: 391-397
- DU Y.Z., et al. (2011) The diagnostic value of circulating stanniocalcin-1 mRNA in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol*, v.104(7), p. 836-840
- DUESTER G. (2008) Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis, *Cell* **134** 921–931
- DURUKAN TOLVANEN A., et al. (2013) Stanniocalcin 1 is important for poststroke functionality, but dispensable for ischemic tolerance. *Neuroscience*, v. 229, p. 49-54
- EMANUELSSON I., NORLIN M. (2012) Protective effects of 27- and 24-hydroxycholesterol against staurosporine-induced cell death in undifferentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*, v. 525(1), p. 44-8
- FAN, Y., et al. (2008) Regulation of programmed cell death by NF-kappaB and its role in tumorigenesis and therapy. *Adv. Exp. Med. Biol.* **615**, 223–250.
- FILVAROFF E.H., et al. (2002) Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice. *Endocrinology* **143**: 3681-3690
- FOO, S.Y., NOLAN, G.P. (1999) NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet.* **15**, 229–235.
- FORSYTHE J.A., et al. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**: 4604-4613
- GÄHWILER B.H., et al. (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* **20**:471-477. Gähwiler BH. Slice cultures of cerebellar, hippocampal and hypothalamic tissue. *Experientia*, v.40(3), p. 235-243. 1984.
- GERRITSEN M.E., et al. (2002) In silico data filtering to identify new angiogenesis targets from a large in vitro gene profiling data set. *Physiol Genomics* **10**: 13-20
- GUARNIERI S., et al. (2009) Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Int J Dev Neurosci*; **27**: 135-147.
- HANSEN, L.A., et al. (2000) Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* **21**, 1271–1279.
- HEART E., et al. (2006) “Glucose-dependent increase in mitochondrial membrane potential, but not cytoplasmic calcium, correlates with insulin secretion in single islet cells,” *American Journal of Physiology*, vol. 290, no. 1, pp. E143–E148

- HEGYESI, H., et al. (2004) Retinoic acid enhances histamine content and H1 receptor expression in human neuroblastoma cell line Paju. *Anticancer Res*, v. 24(3a), p. 1657-1663.
- HOGARTY, M.D. (2003) The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification. *Cancer Letter* 197, 173–179.
- HORN A.P., et al. (2005) Cellular death in hippocampus in response to PI3K pathway inhibition and Oxygen and Glucose deprivation. *Neurochem Res* 30(3): 355-361.
- HU, L.S., et al. (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal* 123, 1086–1092.
- HWANG P.P., LEE T.H. (2007) New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, v. 148(3), p. 479-497.
- ISHIBASHI K. & Imai M. (2002) Prospect of a stanniocalcin endocrine/paracrine system in mammals. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**: F367-75
- ISHIBASHI K., et al. (1998) Molecular cloning of a second human stanniocalcin homologue (STC2). *Biochem Biophys Res Commun* **250**: 252-258
- ISMAIL R.S., et al. (2000) Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Res* **60**: 6744-6749
- JAMES K., et al. (2005) Evidence for stanniocalcin binding activity in mammalian blood and glomerular filtrate. *Kidney Int*, v. 67(2), p. 477-482
- JIANG B.H., et al. (1997) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* **57**: 5328-5335
- JIANG W.Q., et al. (2000) The distribution of stanniocalcin 1 protein in fetal mouse tissues suggests a role in bone and muscle development. *J Endocrinol* **165**: 457-466
- JOENSUU, K., et al. (2008) Tumor dormancy: elevated expression of stanniocalcins in late relapsing breast cancer. *Cancer Lett.* 265, 76–83.
- JUURLINK B., SWEENEY M. (1997) Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. *Neurosci Biobehav* 21:121-128.
- KAHN J., et al. (2000) Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis. *Am J Pathol* **156**: 1887-1900
- KAUR, G., SINGH, J. (2007) Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Research* 1154, 8–21.
- KUME T., et al. (2008) Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci Lett*; 443: 199-203.

- LAAKE J.H., et al. (1999) A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res Prot* 4:173-184.
- LAI, K.P., et al. (2007). Induction of stanniocalcin-1 expression in apoptotic human nasopharyngeal cancer cells by p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 968–975.
- Law, A.Y., et al. (2008) Histone deacetylase inhibitor-induced cellular apoptosis involves stanniocalcin-1 activation. *Exp. Cell Res.* 314, 2975–2984.
- LIPTON. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Ver* 79:1431-1568.
- LIU D., et al. (2012) Human stanniocalcin-1 suppresses angiotensin II-induced superoxide generation in cardiomyocytes through UCP3-mediated anti-oxidant pathway. *PLoS One*, v. 7(5)
- LIU, G., et al. (2010) Stanniocalcin 1 and ovarian tumorigenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 812–827
- LU M., et al. (1994) Stanniocalcin stimulates phosphate reabsorption by flounder renal proximal tubule in primary culture. *Am J Physiol* **267**: R1356-62
- LUO, C.W., et al. (2005) Identification of a stanniocalcin paralog, stanniocalcin-2, in fish and the paracrine actions of stanniocalcin-2 in the mammalian ovary. *Endocrinology* 146, 469–476.
- MADSEN K.L., et al. (1998) Stanniocalcin: a novel protein regulating calcium and phosphate transport across mammalian intestine. *Am J Physiol* **274**: G96-102
- MAXWELL P.H., et al. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8104-8109
- MCCUDDEN C.R., et al. (2002) Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. *J Biol Chem* **277**: 45249-45258
- MCCUDDEN C.R., et al. (2001) Novel expression of the stanniocalcin gene in fish. *J Endocrinol* **171**: 33-44
- MCCUDDEN, C.R., et al. (2004) Co-localization of stanniocalcin-1 ligand and receptor in human breast carcinomas. *Mol. Cell Endocrinol.* 213, 167–172.
- MCEWEN, B.S. (1994) How do sex and stress hormones affect nerve cells? *Ann N Y Acad Sci*, v.743, p. 1-16
- MILET C., et al. (1984) Comparative effects of an extract of *Anguilla* Stannius corpuscles and of an active fragment of human parathyroid hormone (1-34 hPTH) on an anuran batracian, *Xenopus laevis*. *C R Seances Acad Sci III* **297**: 33-36
- MITSUSHIMA, D. (2011) Sex differences in the septo-hippocampal cholinergic system in rats: behavioral consequences. *Curr Top Behav Neurosci*, v. 8, p. 57-71

- MIURA, M. (2012) Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 4(10), p. a008664
- MOLLEREAU C., et al. (2007) Staurosporine differentiation of NPFF2 receptor-transfected SH-SY5Y neuroblastoma cells induces selectivity of NPFF activity towards opioid receptors. *Peptides*; 28: 1125-1128.
- MOORE, E.E., et al. (1999) Stanniocalcin 2: characterization of the protein and its localization to human pancreatic alpha cells. *Horm. Metab. Res* 31, 406–414.
- MORALES-HERNÁNDEZ A., et al. (2012) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis by disruption of intracellular calcium homeostasis in human neuronal cell line SHSY5Y. *Apoptosis*, v. 17(11), p. 1170-1181
- NAKKA V.P., et al. (2008) Molecular Mechanisms of Apoptosis in Cerebral Ischemia: Multiple Neuroprotective Opportunities. *Mol Neurobiol* 37:7-38.
- NGUYEN, A., et al. (2009) Stanniocalcin-1 acts in a negative feedback loop in the prosurvival ERK1/2 signaling pathway during oxidative stress. *Oncogene* 28, 1982–1992.
- NIKONENKO A.G., et al. (2009) Structural Features of Ischemic Damage in the Hippocampus. *The Anatomical Record* 292:1914-1921.
- NOY N., (2010) Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis, *Annu. Rev. Nutr.* 30, 201–217
- OKABE H., et al. (2001) Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 61: 2129-2137
- OLSEN, H.S., et al. (1996) Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1792–1796.
- OZAWA, H. (2005) Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nippon Med Sch*, v. 72(6), p. 316-25
- PÅHLMAN S., et al. (1981) Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Int J Cancer*; 28: 583-589.
- PRICE D. (1999) New order from neurological disorders. *Nature* 399: A3-A5.
- RAVI R., et al. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14: 34-44
- RE, R.N. & COOK, J.L. (2010) The mitochondrial component of intracrine action. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 299(3): H577-H583.
- RICHARDS T.D., et al. (2012) Characterization of stanniocalcin-1 receptors in the rainbow trout. *ISRN Endocrinol* v. 2012

- RODDY G.W., et al. (2012) Stanniocalcin-1 rescued photoreceptor degeneration in two rat models of inherited retinal degeneration. *Mol Ther*, v. 20(4), p. 788-797
- ROSENBLUM W.I. (1997) Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following ischemia/hypoxia. *J Neurotrauma* 14:313-326.
- ROSS, R., et al. (1995) Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth and Differentiation* 6, 449–456.
- SAZONOVA, O., et al. (2008) Stanniocalcin-1 secretion and receptor regulation in kidney cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 294, F788–F794.
- SCHEIN V., et al. (2012) Four stanniocalcin genes in teleost fish: structure, phylogenetic analysis, tissue distribution and expression during hypercalcemic challenge. *Gen Comp Endocrinol.* 15;175(2):344-56.
- SCHNEIDER L., et al. (2011) Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, v. 51(11), p. 2007-2017
- SHAH, R.D., et al. (2013) Sodium valproate potentiates staurosporine-induced apoptosis in neuroblastoma cells via Akt/surviving independently of HDAC inhibition. *J Cell Biochem*, v.114(4), p. 854-863
- SHEIKH-HAMAD, D. (2010) Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium. *Am. J. Physiol-Renal Physiol* **298**(2): f248-f254.
- SHEIKH-HAMAD, D., et al. (2003) Stanniocalcin-1 is a naturally occurring L-channel inhibitor in cardiomyocytes: relevance to human heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H442– H448.
- SHEIKH-HAMAD, D., et al. (2000). Regulation of stanniocalcin in MDCK cells by hypertonicity and extracellular calcium. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 278, F417–F424.
- SHIN, J., & SOHN, Y.C. (2006) Molecular characterization and expression analysis of stanniocalcin-1 in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 214–221.
- SHIN, J., & SOHN, Y.C. (2009) CDNA cloning of Japanese flounder stanniocalcin 2 and its mRNA expression in a variety of tissues. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 153, 24–29.
- SIEGEL GJ, et al. (1999) Hypoxic-Ischemic Brain Injury and Oxidative Stress. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical aspects*. 6^a edição. Lippincott-Raven.
- SINGH J, KAUR G. (2007) Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Res*; 1154: 8-21.

- SONG J.H., et al. (2005) Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p53 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK 1/2 pathway. *J Biol Chem*, v. 280(13), p. 12896-12890
- SRIVASTAV A.K. & SWARUP K. (1982) Calcemic responses of Stannius corpuscle extract in parrots *Psittacula psittacula*. *Experientia* **38**: 869-870
- STOPPINI L., et al. (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173-182.
- STRASSER U. & FISCHER G. (1995) Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods* 57:177-186
- SUBRAMANIAM S. & UNSICKER K. (2010) ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J*, v. 277(1), p. 22-29
- SUNDELL K., et al. (1992) Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) stanniocalcin inhibits in vitro intestinal calcium uptake in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J Comp Physiol [B]* **162**: 489-495
- TAKAGI, Y., et al. (1985) Effects of the removal of the corpuscles of Stannius on the transport of calcium across the intestine of rainbow trout. *Zool Sci* **2**: 523-530
- TAMURA, S., et al. (2011). Clinical significance of STC1 gene expression in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res.* 31, 325–329.
- TSENG, D.Y., et al. (2009). "Effects of stanniocalcin 1 on calcium uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryo." *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **296**(3): R549-557.
- TOHMIYA, Y., et al. (2004) Stanniocalcin-1 as a novel marker to detect minimal residual disease of human leukemia. *Tohoku J. Exp. Med.* 204, 125–133.
- TURNER, J., et al. (2010) Induction of the renal stanniocalcin-1 gene in rodents by water deprivation. *Mol. Cell Endocrinol.* 328, 8–15.
- VARGHESE R., et al. (2002) Overexpression of human stanniocalcin affects growth and reproduction in transgenic mice. *Endocrinology* **143**: 868-876
- VARGHESE, R., et al. (1998) Comparative analysis of mammalian stanniocalcin genes. *Endocrinology* 139, 4714–4725.
- VIDA I. (2010) Morphology of Hippocampal Neurons. Springer Series in Computational Neuroscience, v. 5, p. 27-67
- WAGNER, G.F. & Dimattia, G.E. (2006) The stanniocalcin family of proteins. *Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology* **305**(9): 769-780.
- WAGNER, G.F., et al. (1986) "Purification, characterization, and bioassay of teleocalcin, a glycoprotein from salmon corpuscles of Stannius." *General and Comparative Endocrinology* **63**(3): 481-491.

- WAGNER G.F., et al. (1988) Comparative biochemistry and physiology of teleocalcin from sockeye and coho salmon. *Gen Comp Endocrinol* **72**: 237-246.
- WAGNER, G.F. & JAWORSKI, E. (1994). "Calcium regulates stanniocalcin mRNA levels in primary cultured rainbow trout corpuscles of stannius." *Molecular and Cellular Endocrinology* **99**(2): 315-322.
- WAGNER, G.F., & DIMATTIA, G.E. (2006) The stanniocalcin family of proteins. *J. Exp. Zool. A: Comp. Exp. Biol.* 305, 769–780.
- WANG Y., et al. (2009) Stanniocalcin-1 suppresses superoxide generation in macrophages through induction of mitochondrial UCP2. *J Leukoc Biol*, v. 86(4), p. 981-988
- WARY K.K., et al. (2003) Analysis of VEGF-responsive genes involved in the activation of endothelial cells. *Mol Cancer* **2**: 1-12
- WASCHER R.A., et al. (2003) Stanniocalcin-1: a novel molecular blood and bone marrow marker for human breast cancer. *Clin Cancer Res* **9**: 1427-1435
- WELCSH P.L., et al. (2002) BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7560-7565
- WESTBERG J.A., et al. (2007) Hypoxic preconditioning induces neuroprotective stanniocalcin-1 in brain via IL-6 signaling. *Stroke*, v. 38(3), p. 1025-1030. 2007.
- WONG C.K., et al. (2002) Effects of dibutyryl cAMP on stanniocalcin and stanniocalcin-related protein mRNA expression in neuroblastoma cells. *J Endocrinol*, v. 173(1)
- WU S., et al. (2006) Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* 281, 5120–5127.
- XIE H.R., et al. (2010) SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)*, v. 123(8), p. 1086-1092
- XUN Z., et al. (2012) Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells. *Mech Ageing Dev*, v. 133(4), v. 176-85.
- YAMAGAMI, K., et al. (1994) Cd²⁺ and Co²⁺ at micromolar concentrations stimulate catecholamine secretion by increasing the cytosolic free Ca²⁺ concentration in cat adrenal chromaffin cells. *Brain Res.* **646**, 295–298
- YEUNG B.H., et al. (2012) Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol*, v. 349(2), p. 272-280
- YEUNG H.Y., et al. (2005) Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells. *Endocrinology* **146**: 4951-4960
- YOSHIKO, Y. & Aubin J.E. (2004) "Stanniocalcin 1 as a pleiotropic factor in mammals." *Peptides* **25**(10): 1663-1669.

- YOSHIKO Y., et al. (2003) Stanniocalcin 1 stimulates osteoblast differentiation in rat calvaria cell cultures. *Endocrinology* **144**: 4134-4143
- YOSHIKO Y., et al. (1999) Evidence for stanniocalcin gene expression in mammalian bone. *Endocrinology* **140**: 1869-1874
- ZAIDI D., et al (2012) Stanniocalcin-1 co-localizes with insulin in the pancreatic islets. *ISRN Endocrinol*, v. 2012
- ZHANG K., et al. (2000) Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3637-3642
- ZHANG K.Z., et al. (1998) High expression of stanniocalcin in differentiated brain neurons. *Am J Pathol* **153**: 439-445