



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia | Departamento de Química e Farmácia
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**O PAPEL DE TRIB2 NO METABOLISMO CELULAR:
ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TRIB2 EM
TECIDOS METABOLICAMENTE ATIVOS**

Vanessa Rodrigues Viegas

2020

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia | Departamento de Química e Farmácia
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**O PAPEL DE TRIB2 NO METABOLISMO CELULAR:
ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TRIB2 EM
TECIDOS METABOLICAMENTE ATIVOS**

Vanessa Rodrigues Viegas

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação de
Professora Doutora Ana Luísa De Sousa-Coelho

2020

O PAPEL DE TRIB2 NO METABOLISMO CELULAR: ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TRIB2 EM TECIDOS METABOLICAMENTE ATIVOS

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Vanessa Viegas

Copyright© 2020 Vanessa Rodrigues Viegas

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

“**Insiste, persiste e não desiste**”, foi a frase que tantas vezes repeti ao longo do curso. Houve muitos momentos em que pensei em desistir, mas felizmente, os meus pais ensinaram-me a lutar sempre até ao fim. A eles quero agradecer toda a educação que me deram, todos os sacrifícios que por mim fizeram e todo o apoio para a concretização de mais um objetivo. Obrigada por acreditarem sempre em mim.

Quero agradecer também ao meu irmão, a pessoa que sempre me protegeu e quando não sei como continuar o meu caminho, é ele que me ajuda e me guia. Mesmo longe está sempre presente.

Um obrigado à minha irmã que acompanhou de perto todo o meu caminho e aguentou todos os meus altos e baixos. Sem a sua companhia tinha sido muito mais difícil. Sei que me ausentei de muitos momentos em família devido aos estudos, mas também sei que, daqui em diante, conseguirei compensar e todo o esforço valeu a pena.

Um agradecimento muito especial à pessoa que, infelizmente, não conseguiu acompanhar todo este meu percurso, mas que sempre me apoiou em todas as circunstâncias. Obrigada Rafael Ramos por sempre teres feito o possível e o impossível para eu não duvidar de mim e por me fazeres ver sempre o lado positivo. Por todas as vezes em que eu estava cansada e tu ficavas acordado para me fazeres companhia a estudar. Consegui atingir este objetivo porque sei que tu não me deixarias desistir. Onde quer que estejas, espero que estejas orgulhoso de mim.

Gostaria de agradecer também à minha orientadora Professora Doutora Ana Luísa De Sousa-Coelho por toda a aprendizagem, apoio, compreensão e paciência. Obrigada por toda a disponibilidade, por acreditar em mim, por exigir sempre mais e por me dar tanta força e motivação. **MUITO OBRIGADA!**

Obrigada a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte da minha caminhada: amigos, colegas de trabalho e colegas de curso. Um especial obrigado à Luísa Guerreiro, Patrícia Guerreiro e Carlos Sousa por termos superado este caminho juntos e ao Júlio Mota por ter sido um ótimo colega de laboratório e por estar sempre disponível quando me surgiam dúvidas.

Obrigada Hugo Santos por todo o apoio, força e motivação. Mesmo quando eu estava no meu limite conseguiste sempre puxar-me para cima e “enviar-me luz” para conseguir continuar.

Agradeço aos Investigadores Clévio Nóbrega (colaboração da experimentação animal), Wolfgang Link e Bibiana Ferreira (desenvolvimento da parte experimental) por me terem “acolhido” de forma tão afável e por me terem dado a oportunidade de uma grande aprendizagem.

Sem vocês nada disto seria possível.

Um muito obrigada a todos que me acompanharam neste caminho!

Resumo

A resistência à insulina é um fator chave na patogênese da síndrome metabólica e na diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), potenciando outros problemas de saúde, tal como o aumento do risco para alguns tipos de cancro.

TRIB2 é um dos três membros da família *Tribbles* de proteínas pseudoquinases. Em vez da fosforilação direta das proteínas alvo, atuam como adaptadores nas vias de sinalização de importantes processos celulares. TRIB2 interage e ativa a proteína AKT associada à supressão da FOXO e dos seus genes alvo. Os fatores de transcrição FOXO são os principais alvos da ação da insulina e a sua desregulação promove o desenvolvimento de diabetes. A via de sinalização PI3K/AKT é uma das mais frequentemente ativadas no cancro, pois a hiperativação de AKT está associada ao aumento da proliferação celular e metabolismo de energia celular. Assim, surgiu a hipótese que TRIB2 pode desempenhar um papel crucial no metabolismo celular.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar os níveis de expressão de TRIB2 em determinados tecidos metabólicos (fígado, músculo esquelético e tecidos adiposos branco (WAT) e castanho (BAT)) em resposta a condições específicas (obesidade, DM2, resistência à insulina, exposição ao frio, tratamento com rosiglitazona) em amostras de tecidos de humanos e de origem murina, utilizando a base de dados *GEO* (NCBI). Foi também avaliada quantitativamente a expressão génica de TRIB2 no tecido adiposo de ratinhos magros e obesos, através da realização de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Na análise *GEO* verificou-se no fígado uma diminuição da expressão de TRIB2 na obesidade, enquanto que no WAT ocorreu um aumento na mesma condição. Além disso, a sua expressão no WAT diminuiu em resposta ao tratamento com rosiglitazona. No músculo esquelético não se encontraram diferenças significativas na sua expressão na obesidade, DM2 ou resistência à insulina. Ao comparar o BAT e WAT, verificou-se uma expressão preferencial de TRIB2 no WAT. TRIB2 aumentou, no BAT, em resposta ao frio.

Na análise quantitativa de TRIB2 no WAT, não foi possível observar alteração estatisticamente significativa na sua expressão dependente da obesidade induzida pela dieta rica em gorduras.

Palavras-chave: Obesidade, Diabetes, Metabolismo, Tecido Adiposo, *Tribbles*, TRIB2

Abstract

Insulin resistance is a key factor in the pathogenesis of the metabolic syndrome and in type 2 diabetes, potentiating other health problems, such as the increased risk for some types of cancer.

TRIB2 is one of three members of the Tribbles family of pseudokinases proteins. Instead of direct phosphorylation of target proteins, they act as adapters in the signaling pathways of important cellular processes. TRIB2 interacts and activates AKT protein, associated with suppression of FOXO and its target genes. FOXO transcription factors are the main targets of the action of insulin and its deregulation promotes the development of diabetes. PI3K/AKT signaling pathway is one of the most frequently activated in cancer, as AKT hyperactivation is associated with increased cell proliferation and cellular energy metabolism. Thus, our hypothesis is that TRIB2 may play a crucial role in cellular metabolism.

This study aimed to evaluate the levels of TRIB2 expression in certain metabolic tissues (liver, skeletal muscle and white and brown adipose tissues (WAT and BAT, respectively) in response to specific conditions (obesity, DM2, insulin resistance, cold exposure, treatment with rosiglitazone) in samples of human and murine tissues, using the GEO database (NCBI). The gene expression of TRIB2 in the adipose tissue of lean and obese mice was also quantitatively evaluated by performing Real-time polymerase chain reaction (PCR).

In the GEO analysis there was a decrease in the expression of TRIB2 in obesity in the liver, while in WAT there was an increase in the same condition. In addition, its expression in WAT decreased in response to treatment with rosiglitazone. In skeletal muscle, no significant differences were found in its expression in obesity, DM2 or insulin resistance. When comparing BAT and WAT, there was a preferential expression of TRIB2 in WAT. TRIB2 increased in BAT, in response to the cold.

In the quantitative analysis of TRIB2 in WAT, it was not possible to observe a statistically significant change in its expression dependent on obesity induced by a high-fat diet.

Keywords: Obesity, Diabetes, Metabolism, Adipose Tissue, Tribbles, TRIB2

Índice

Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
1.1. Metabolismo e vias metabólicas	2
1.1.1. Metabolismo dos hidratos de carbono.....	3
1.1.1.1. Glicólise	4
1.1.1.2. Gluconeogénese	5
1.1.1.3. Glicogénese	7
1.1.1.4. Glicogenólise.....	7
1.1.2. Metabolismo dos lípidos	9
1.1.2.1. Beta-oxidação.....	10
1.1.2.2. Cetogénese	12
1.2. Obesidade.....	13
1.2.1. Tecido Adiposo	15
1.3. Diabetes mellitus.....	16
1.3.1. Pâncreas e insulina	18
1.3.1.1. Via da sinalização da insulina InsR/PI3K/AKT/FOXO.....	23
1.3.2. Diabetes tipo 1.....	24
1.3.3. Diabetes tipo 2.....	25
1.4. FOXO	26
1.4.1. Regulação das FOXOs por fosforilação pela via PI3K/AKT	27
1.5. Pseudoquinases Tribbles.....	28
1.5.1. TRIB1.....	30
1.5.2. TRIB2.....	30
1.5.3. TRIB3.....	31
1.5.4. Cancro	32
2. Objetivo	33
3. Metodologia.....	33

3.1. Análise da expressão de Trib2 na base de dados GEO.....	33
3.2. Análise da expressão de TRIB2 em tecidos de modelos animais	36
3.2.1. Animais	36
3.2.2. Tecidos	36
3.2.3. RNA	37
3.2.3.1. Extração de RNA	37
3.2.3.2. Quantificação de RNA	38
3.2.3.3. Síntese de cDNA	38
3.2.3.4. Primers	39
3.2.3.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Real time PCR - qPCR)	42
3.2.3.6. Quantificação da expressão relativa de mRNA.....	44
4. Resultados	44
4.1. Avaliação dos níveis de expressão de TRIB2 em tecidos metabólicos usando os Perfis GEO	44
4.1.1. Fígado.....	45
4.1.2. Músculo esquelético	45
4.1.3. Comparação da expressão de TRIB2 no BAT e WAT de modelos de ratos e ratinhos	46
4.1.4. Tecido adiposo branco (WAT).....	47
4.1.4.1. Expressão de TRIB2 e Ucp1 em pré-adipócitos primários do tecido adiposo branco inguinal (scWAT) de ratinhos tratados com rosiglitazona	48
4.1.5. Tecido adiposo castanho (BAT).....	49
4.1.5.1. Expressão de TRIB2 no BAT de ratinhos após exposição ao frio	49
4.2. Análise da expressão gênica	50
4.2.1. Quantificação da expressão relativa de mRNA.....	50
5. Discussão	52
6. Conclusões e perspectivas futuras	56
7. Referências Bibliográficas	57
ANEXOS	64

ANEXO 1 – Poster: TRI(B)pping Over Metabolism: Exploring the Role of TRIB2 in Metabolic Tissues	64
ANEXO 2 – Poster: Análise da expressão de TRIB2 em tecidos sensíveis à insulina associados à obesidade.	65
ANEXO 3 – Poster: TRIB2 Gene Expression Regulation in Brown Adipose Tissue	66

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Interdependência do catabolismo e do anabolismo e o papel central do ATP	3
Figura 1.2 - Via da gluconeogênese e glicólise.....	6
Figura 1.3 - Via da Glicogênese e glicogenólise.....	8
Figura 1.4 - Ativação dos ácidos gordos de cadeia longa (mais de 12 carbonos).....	11
Figura 1.5 - β -oxidação dos ácidos gordos.....	11
Figura 1.6 - Ciclos adicionais do acil-CoA (hélice de Lynen).....	12
Figura 1.7 - Via da cetogênese	13
Figura 1.8 - Pâncreas	19
Figura 1.9 - Ação da insulina nas células	20
Figura 1.10 - Trajeto da insulina no organismo	21
Figura 1.11 - Perfil da secreção de insulina induzida por glicose.....	22
Figura 1.12 - Estrutura proteica básica das isoformas TRIB	29
Figura 3.1 – Perfil da expressão génica.....	34
Figura 3.2 – Barra de pesquisa dos perfis GEO	34
Figura 3.3 - Exemplo de uma pesquisa usando os perfis GEO	35
Figura 3.4 - Exemplo do <i>download</i> da informação do Perfil GEO.....	35
Figura 3.5 - Exemplo da informação dos Perfis GEO transferidos para Excel.....	35
Figura 3.6 - Placa de qPCR com a respetiva localização dos genes (de interesse e normalizadores).....	43
Figura 4.1 - Expressão de TRIB2 no fígado.....	45
Figura 4.2 - Expressão de TRIB2 no músculo esquelético	46
Figura 4.3 - Níveis de TRIB2 e Ucp1 no BAT e no WAT	47
Figura 4.4 - Expressão de TRIB2 no WAT.....	48
Figura 4.5 - Expressão de TRIB2 e Ucp1 em pré-adipócitos primários do scWAT tratados e não tratados com rosiglitazona.	49
Figura 4.6 - Níveis de TRIB2 no BAT após exposição ao frio	49
Figura 4.7 - Expressão de TRIB1 entre grupo LFD vs. HFD normalizado com o gene de referência Ciclofilina (A) e TBP (B).....	50
Figura 4.8 - Expressão de TRIB2 entre grupo LFD vs. HFD normalizado com o gene de referência Ciclofilina (A) e TBP (B).....	51
Figura 4.9 - Expressão de TRIB3 entre grupo LFD vs. HFD normalizado com o gene de referência Ciclofilina (A) e TBP (B).....	51

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - ÍMC e respetiva classificação	14
Tabela 1.2 - Valores de glicémia plasmática normal	18
Tabela 1.3 - Valores de glicémia plasmática na DM	18
Tabela 3.1 – Reagentes e respetivos volumes utilizados	39
Tabela 3.2 - Características dos primers selecionados	40
Tabela 3.3 - Genes de interesse e genes normalizadores	41
Tabela 3.4 - Reagentes e respetivos volumes utilizados para elaboração do Primer mix.....	41
Tabela 3.5 - Reagentes e respetivos volumes utilizados para preencher cada poço da placa qPCR	42
Tabela 3.6 - Reagentes e respetivos volumes totais a preparar de cada mix.....	42

Lista de Abreviaturas

- ADP - adenosina difosfato
- AGJ - anomalia da glicemia em jejum
- AMP - adenosina monofosfato, do inglês *adenosine monophosphate*
- AMPc - adenosina monofosfato ciclico, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*
- AT - tecido adiposo, do inglês *adipose tissue*
- ATF4 - fator de transcrição ativador 4, do inglês *activating transcription factor 4*
- ATP - adenosina trifosfato, do inglês *adenosin triphosphate*
- BAT - tecido adiposo castanho, do inglês *brown adipose tissue*
- Bcl-2 - do inglês *B-cell lymphoma 2*
- CAT I - carnitina aciltransferase I
- CAT II - carnitina aciltransferase II
- C/EBP - proteína de ligação do intensificador de CCAAT, do inglês *CCAAT-enhancer-binding protein*
- CHOP - proteína homóloga C/EBP, do inglês *C/EBP homologous protein*
- CoA - coenzima-A
- CRE - proteína responsiva ao AMPc, do inglês *cAMP response elements*
- CREB - proteína de ligação responsiva ao AMPc, do inglês *cAMP binding response elements*
- Ct - ciclos obtidos na reação em cadeia da polimerase, do inglês *cycle threshold*
- DG - diabetes gestacional
- DM - diabete *mellitus*
- DM1 - diabetes *mellitus* tipo 1
- DM2 - diabetes *mellitus* tipo 2
- cDNA - DNA complementar, do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*
- FW - do inglês *primer forward*
- FADH₂ - dinucleótido de flavina e adenina, do inglês *flavin adenine dinucleotide*
- FOXO - do inglês *forkhead box O*
- G6P - glicose-6-fosfato, do inglês *glucose-6-phosphate*
- GDS - do inglês *gene data set*
- GEO - do inglês *gene expression omnibus*
- GLP-1 - péptido semelhante a glucagon 1, do inglês *glucagon-like peptide-1*
- GLUT2 - Transportador de glicose 2, do inglês *glucose transporter 2*
- GLUT4 - Transportador de glicose 4, do inglês *glucose transporter 4*

GLUTs - transportadores de glicose, do inglês *glucose transporters*

GTP - guanosina trifosfato, do inglês *guanosine triphosphate*

HA - hipertensão arterial

HC - hidratos de carbono

HDL - lipoproteínas de alta densidade, do inglês *high density lipoprotein*

HFD - dieta em que 60% das calorias é proveniente de gordura, do inglês *high fat diet*

IDL - lipoproteínas de densidade intermédia, do inglês *intermediate density lipoprotein*

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina, do inglês *insulin-like growth factor 1*

IL-8 - interleucina 8

IMC - índice de massa corporal

InsR - receptor de insulina tirosina quinase, do inglês *insulin receptor*

LDL - lipoproteínas de baixa densidade, do inglês *low density lipoprotein*

LFD - dieta em que 10% das calorias é proveniente de gordura, do inglês *low fat diet*

LMA - leucemia mielóide aguda

LPS - lipopolissacarídeo

MAPKs - proteínas quinases ativadas por mitógenos, do inglês *mitogen-activated protein kinase*

MAPKK - proteína quinase quinase ativada por mitogénio, do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase*

MCP-1 - proteína quimiotática de monócitos 1, do inglês *monocyte chemotactic protein-1*

NADH – dinucleótido de nicotinamida e adenina, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*

NAFLD - doença hepática gordurosa não alcoólica, do inglês *non-alcoholic fatty liver disease*

OMS - organização mundial da saúde

PCOS - síndrome do ovário poliquístico, do inglês *polycystic ovary syndrome*

PCR - reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PFK-1 - fosfofrutoquinase-1, do inglês *phosphofructokinase-1*

P_i - fosfato inorgânico, do inglês *inorganic phosphate*

PI3K - fosfoinositídeo quinase, do inglês *phosphoinositide 3-kinase*

PKA - proteína quinase A, do inglês *protein kinase A*

PPAR γ - recetores ativados por proliferador de peroxissoma, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PP_i - pirofosfato inorgânico, do inglês *inorganic pyrophosphate*

Ppia - ciclofilina, do inglês *peptidylprolyl isomerase A*

RNase H - ribonuclease H

RV - do inglês *primer reverse*

scWAT - tecido adiposo branco subcutâneo, do inglês *subcutaneous white adipose tissue*

TCA - ciclo do ácido cítrico, do inglês *tricarboxylic acid cycle*

TBP - proteína de ligação TATA, do inglês *TATA binding protein*

TDG - tolerância diminuída à glicose

TG - triglicéridos

TNF α - fatores de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*

TRIBs - tribbles

UCP - proteína-1 desacopladora, do inglês *uncoupling protein-1*

UTP - trifosfato de uridina, do inglês *uridine triphosphate*

VLDL - lipoproteínas de muito baixa densidade, do inglês *very low density lipoprotein*

WAT - tecido adiposo branco, do inglês *white adipose tissue*

1. Introdução

A resistência à insulina é um ponto principal da síndrome metabólica e na diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). Ambas as doenças atingiram proporções epidêmicas em todo o mundo. O aumento da prevalência de DM2 e da síndrome metabólica, hoje em dia, acredita-se que seja o resultado de um estilo de vida cada vez mais sedentário associado a uma alimentação de má qualidade, em indivíduos geneticamente susceptíveis. Ou seja, nestes indivíduos, existe uma predisposição para o ganho consecutivo de peso, o que leva à obesidade, pois o excesso de energia é armazenado no tecido adiposo. Além disso, há uma acumulação de lípidos em “locais ectópicos”, tais como, fígado, músculo esquelético e, possivelmente, em células pancreáticas e rins⁽¹⁾. Estes padrões da obesidade e da DM podem incrementar outros problemas de saúde, tal como, o aumento do risco para alguns tipos de cancro⁽²⁾.

As proteínas *Tribbles* (TRIBs) são descritas como sendo reguladoras da ativação de vários processos de sinalização intracelular, com várias funções que se estendem desde processos de mitose e ativação celular até apoptose e modulação da expressão génica⁽³⁾. Em vez da fosforilação direta das proteínas alvo, os TRIBs atuam como adaptadores nas vias de sinalização de importantes processos celulares.^(4,5)

O trabalho de laboratório feito para a elaboração desta dissertação centrou-se no gene TRIB2, um dos três genes membros da família dos TRIBs⁽³⁾. As funções de TRIB2 são bastante diversas e pensa-se que desempenha um papel na inflamação e diferenciação celular, incluindo a formação de tumores⁽⁶⁾. O TRIB2 exerce uma interação e ativa a proteína quinase AKT/PKB e, por conseguinte, é associada à supressão da atividade das proteínas FOXO⁽⁴⁾ e da expressão de genes alvo dependentes de FOXO⁽⁵⁾. As proteínas FOXO desempenham um papel importante na sinalização insulínica e em diversas funções fisiológicas, incluindo proliferação celular, apoptose e metabolismo⁽⁷⁾.

Os objetivos deste trabalho incluem avaliar os níveis de expressão de TRIB2 nos tecidos metabólicos (fígado, músculo esquelético e tecidos adiposos) em resposta a condições específicas (obesidade, DM2 e resistência à insulina) e estímulos específicos (exposição ao frio e tratamento com rosiglitazona) em amostras de tecidos de humanos e modelos animais (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*), utilizando a base de dados *Gene Expression Omnibus (GEO)*. Além disso, avaliar a expressão génica de TRIB2 no tecido adiposo branco subcutâneo (scWAT) de modelos animais (*Mus musculus*) alimentados com dieta em que 10% das calorias é proveniente de gordura (*Low Fat Diet - LFD*) e dieta em que 60% das calorias é proveniente

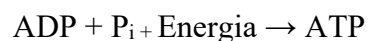
de gordura (*High Fat Diet* - HFD) através da realização da Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa, com o propósito de validar o que se observou no tecido adiposo branco dos dados *GEO*.

Uma vez que há ainda pouca informação sobre TRIB2 relacionada com os tecidos metabólicos, o intuito é aprofundar o conhecimento sobre a sua expressão, pois parece ser fundamental para o potencial reconhecimento de TRIB2 como um alvo farmacológico em distúrbios metabólicos.

1.1. Metabolismo e vias metabólicas

O metabolismo é o conjunto de modificações químicas que ocorrem no organismo. Compreende o catabolismo (processo em que as grandes moléculas são desdobradas em moléculas menores, com libertação de energia) e o anabolismo (processo em que as pequenas moléculas se combinam para formar outras de maior dimensão, com consumo de energia)⁽⁸⁾.

As moléculas de menores dimensões são conduzidas às células e aí catabolizadas, sendo a energia libertada utilizada para combinar adenosina difosfato (ADP) e um grupo fosfato inorgânico (P_i), formando adenosina trifosfato (ATP)⁽⁸⁾:



O ATP é muitas vezes denominado “moeda de troca energética”, pois, quando consumido ou desdobrado em ADP, disponibiliza energia para utilização pela célula⁽⁸⁾.

O catabolismo e o anabolismo são dois processos interdependentes em que o ATP tem um papel central, como se representa na **Figura 1.1**⁽⁹⁾.

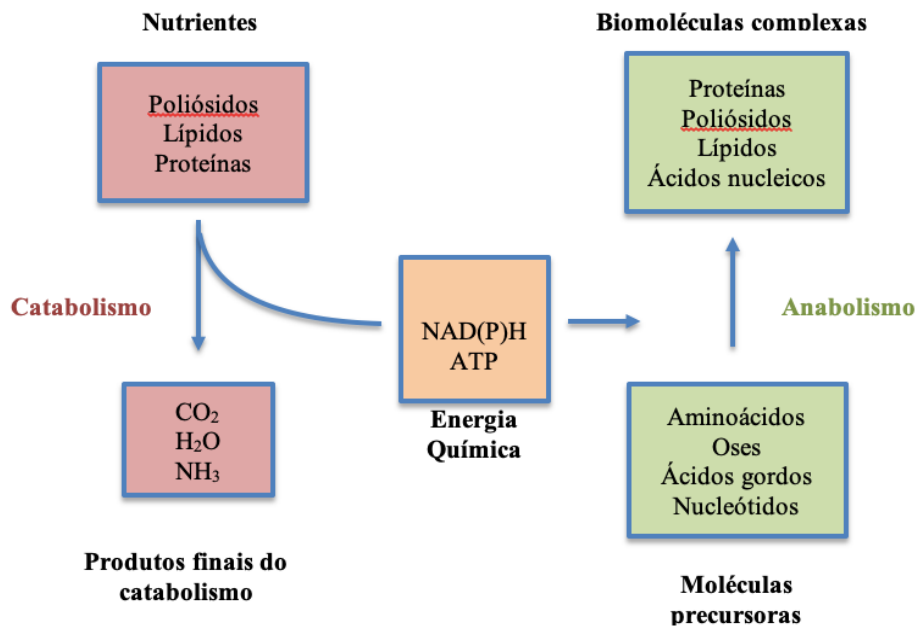


Figura 1.1 - Interdependência do catabolismo e do anabolismo e o papel central do ATP

(adaptado de⁽⁹⁾)

1.1.1. Metabolismo dos hidratos de carbono

Os hidratos de carbono (HC) desempenham vários papéis cruciais nos processos metabólicos dos organismos vivos. Servem como fontes de energia e como elementos estruturais nas células vivas⁽¹⁰⁾.

Os produtos da degradação dos HC são os monossacáridos. Destes, a glicose é o mais importante⁽⁸⁾. Nos vertebrados, a glicose é transportada por todo o corpo no sangue. Se as reservas de energia celular são baixas, a glicose é degradada pela via glicolítica⁽¹⁰⁾.

As moléculas de glicose excedentes podem ser utilizadas para formar glicogénio (armazena energia a curto prazo e em quantidades limitadas) ou pode ser parcialmente desdobrada e os seus componentes serem utilizados para formar gordura (armazena energia a longo prazo e em grande quantidade). A maioria do glicogénio do organismo está armazenado no músculo esquelético e no fígado⁽⁸⁾.

O glicogénio é um polissacárido de armazenamento que consiste em resíduos de D-glicose. Os resíduos de glicose são unidos por α -1,4, que representa a maioria das ligações, e ligações α -1,6, que constituem os pontos de ramificação. Juntos, eles dão à molécula uma estrutura ramificada. As vantagens da natureza altamente ramificada são o aumento da solubilidade e a capacidade de concentrar uma molécula maior num espaço menor⁽¹¹⁾.

Os requisitos de energia de muitos tecidos (por exemplo, cérebro, glóbulos vermelhos e células musculares esqueléticas) dependem de um fluxo ininterrupto de glicose. Dependendo dos requisitos metabólicos de uma célula, a glicose também pode ser usada para sintetizar, por exemplo, outros monossacáridos, ácidos gordos e certos aminoácidos⁽¹⁰⁾.

1.1.1.1. Glicólise

O metabolismo dos HC inicia-se com a glicólise, no citosol⁽⁸⁾.

A glicólise é constituída por uma série de 10 reações químicas que convertem a energia armazenada numa molécula de glicose em quatro moléculas de ATP e duas moléculas de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH). Na presença de oxigénio, os dois piruvatos produzidos como resultado da glicólise podem ser posteriormente catabolizados em três moléculas de dióxido de carbono (CO₂) e uma molécula de Guanosina Trifosfato (GTP). As moléculas NADH e dinucleótido de flavina e adenina (FADH₂) resultantes transportam os seus eletrões para a cadeia transportadora de eletrões, impulsionando a produção de mais ATP através da fosforilação oxidativa⁽¹²⁾.

De uma maneira mais geral, a glicólise pode ser dividida em quatro fases⁽⁸⁾:

1. Entrada de ATP
2. Clivagem do açúcar
3. Produção de NADH
4. Produção de ácido pirúvico e ATP

Os passos da glicólise estão esquematizados na **Figura 1.2**.

A via glicolítica pode ser resumida na seguinte equação⁽¹⁰⁾:



O fluxo da glicose através da via glicolítica é regulado de forma a manter os níveis de ATP e de precursores biossintéticos constantes. O ATP é então indicador de um estado celular de elevada energia e a Adenosina monofosfato (AMP) o indicador de um estado de baixa energia celular. A taxa na qual a via glicolítica opera numa célula é feita pela regulação das três enzimas que catalisam as três reações irreversíveis (1, 2 e 3 na **Figura 1.2**): a hexoquinase, a fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) e a piruvato quinase⁽⁹⁾.

1.1.1.2. Gluconeogénese

A gluconeogénese é a formação de novas moléculas de glicose a partir de precursores que não são HC e ocorre principalmente no fígado. Estas moléculas precursoras incluem o lactato, piruvato, glicerol e moléculas derivadas de aminoácidos. Em condições de acidose metabólica ou jejum, o rim pode produzir pequenas quantidades de glicose. Entre refeições, os níveis adequados de glicose no sangue são mantidos pela hidrólise do glicogénio hepático. Quando este se esgota (por exemplo, em jejum ou exercício físico intenso), a via da gluconeogénese fornece ao corpo as quantidades adequadas de glicose. Órgãos como o cérebro e os glóbulos vermelhos dependem exclusivamente da glicose como fonte de energia⁽¹⁰⁾.

Mesmo quando são fornecidos alimentos, a produção de glicogénio a partir de aminoácidos provenientes da dieta pode continuar a ocorrer no fígado por algum tempo, denominando-se como gluconeogénese pós-prandial e ocorre para garantir um adequado armazenamento de glicogénio no fígado⁽¹³⁾.

A sequência de reação na gluconeogénese é amplamente o inverso da glicólise. Na **Figura 1.2** está esquematizado o processo da gluconeogénese e da glicólise.

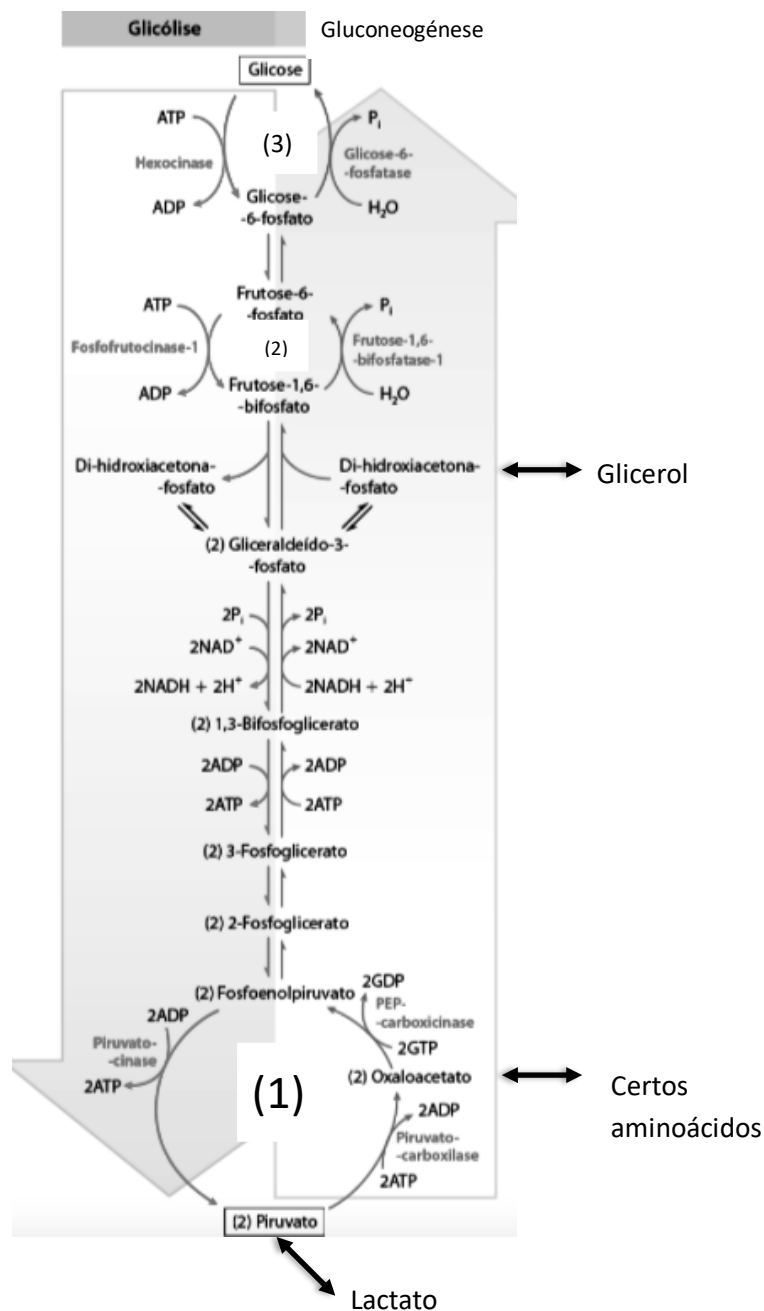


Figura 1.2 - Via da gluconeogénese e glicólise. As três enzimas (hexoquinase, fosfofrutoquinase-1 e a piruvato quinase, representadas por 1, 2 e 3, respetivamente) catalisam as três reações irreversíveis. (adaptado de⁽¹⁴⁾)

Os principais substratos para a gluconeogénese são certos aminoácidos (derivados do músculo), lactato (formado nos músculos e glóbulos vermelhos) e glicerol (produzido a partir da degradação dos triacilgliceróis). A gluconeogénese e a glicólise não ocorrem simultaneamente. Na glicólise, o piruvato é convertido em acetil coenzima-A (acetil-CoA) ou em lactato⁽¹⁰⁾.

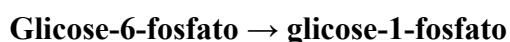
1.1.1.3. Glicogénese

A glicose em excesso é armazenada na forma de glicogénio e a sua síntese ocorre após a ingestão de uma refeição. A glicogénese envolve o seguinte conjunto de reações⁽¹⁰⁾.

- **Síntese de glicose-1-fosfato:** o substrato para a síntese de glicogénio, isto é, a glicose, é inicialmente fosforilada no Carbono 6, originando glicose-6-fosfato⁽⁹⁾.



A glicose-6-fosfato é posteriormente convertida em glicose-1-fosfato pela ação da fosfoglucomutase⁽⁹⁾.



- **Síntese de glicose difosfato de uridina (UDP-glicose):** A glicose-1-fosfato combina-se com o trifosfato de uridina (UTP) para formar UDP-glicose numa reação catalisada pela ação da UDP glicose pirofosforilase⁽⁹⁾.



- **Síntese de glicogénio a partir de UDP-glicose.** A formação de glicogénio a partir de UDP-glicose requer duas enzimas: a **glicogénio sintase**, que catalisa a transferência do grupo glucosil de UDP-glicose para as extremidades não redutoras de glicogénio e amilo- $\alpha(1,4 \rightarrow 1,6)$ -glucosil transferase (**enzima de ramificação**), que cria as ligações $\alpha(1,6)$ para os ramos da molécula⁽¹⁰⁾.

A síntese de glicogénio requer um tetrassacarídeo preexistente composto por quatro resíduos de glucosil ligados no $\alpha(1,4)$. O primeiro desses resíduos está ligado a um resíduo específico de tirosina numa proteína *primer* chamada glicogenina. A cadeia de glicogénio é então estendida pela glicogénio sintase e pela enzima de ramificação⁽¹⁰⁾.

A via da glicogénese pode ser observada na **Figura 1.3**.

1.1.1.4. Glicogenólise

A glicogenólise consiste na via bioquímica na qual ocorre a decomposição do glicogénio originando glicose e glicose-6-fosfato, ocorrendo esta reação nos hepatócitos e nos miócitos. Este processo está sob a regulação da enzima glicogénio fosforilase⁽¹¹⁾. Esta enzima, no citosol, catalisa a remoção de um resíduo de glicose da extremidade não redutora da molécula de

glicogénio. A ligação osídica (α -1,4) que junta dois resíduos de glicose sofre um ataque nucleofílico pelo fosfato inorgânico (Pi) e, assim, produzir glicose-1-fosfato^(9,10). Nos lisossomas a degradação do glicogénio faz-se por hidrólise e não por fosforólise, pela ação de um maltase ácido⁽⁹⁾. Esta reação é catalisada pela enzima amilo- α -1,6-glicosidase que inicia a remoção dos pontos de ramificação α -1,6 ao transferir os três resíduos exteriores, dos quatro resíduos existentes de glicose, ligados ao ponto de ramificação para um ponto próximo não redutor. Seguidamente, é removido o único resíduo de glicose ligado a cada ponto de ramificação. O produto final é a glicose livre⁽¹⁰⁾.

A glicose-1-fosfato, o principal produto da glicogenólise, é desviada para a glicólise nas células musculares para gerar energia para a contração muscular. Nos hepatócitos, ocorre conversão da glicose-1-fosfato em glicose pela enzima fosfoglucomutase e glicose-6-fosfatase, sendo então libertada no sangue⁽¹⁰⁾.

A via da glicogénólise é apresentada na **Figura 1.3**.

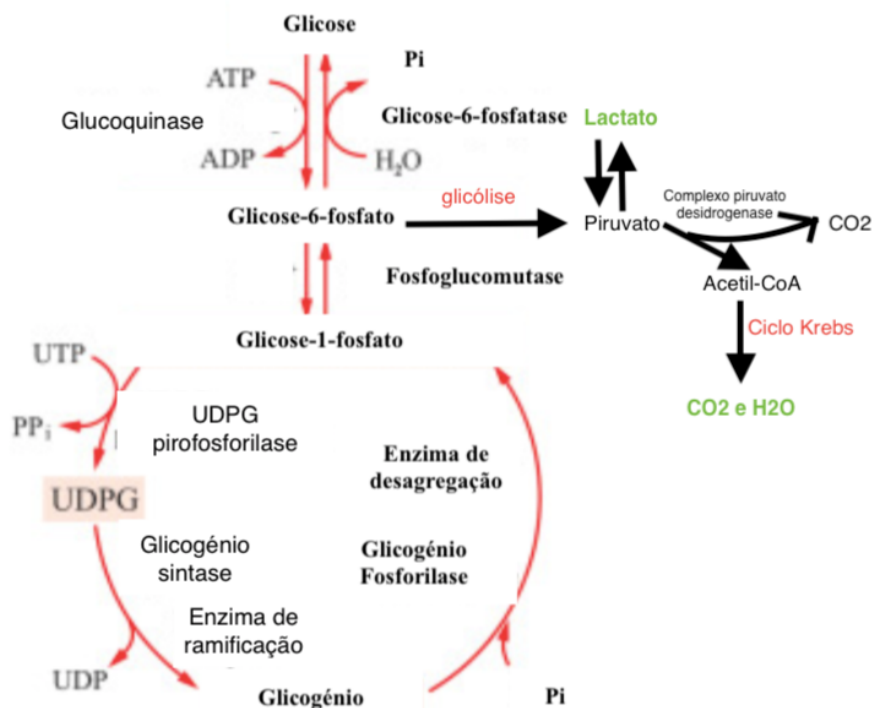


Figura 1.3 - Via da Glicogénese e glicogénólise (adaptado de⁽¹⁵⁾)

1.1.2. Metabolismo dos lípidos

Os lípidos compreendem um número enorme de moléculas quimicamente distintas e são estruturalmente bastante diversas⁽¹⁶⁾. Têm muitas funções biológicas importantes, tais como, atuar como componentes estruturais das membranas celulares, servir como fontes de armazenamento de energia e participar em vias de sinalização⁽¹⁷⁾.

Os lípidos são definidos como pequenas moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas e encontram-se divididos em oito categorias: ácidos gordos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, policétidos (derivados da condensação das subunidades cetoacil), lípidos de esterol e lípidos de prenol (derivados da condensação de subunidades de isopreno)⁽¹⁷⁾.

O metabolismo lipídico (anabolismo e catabolismo) gera uma variedade de intermediários biológicos. Muitos desses intermediários são moléculas lipídicas bioativas que são produzidas pela ativação de várias vias de sinalização e também podem regular várias vias de sinalização. O metabolismo lipídico conecta-se às redes de sinalização na regulação do crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, inflamação, motilidade e homeostase da membrana celular. Ainda assim, o metabolismo lipídico pode também alterar a composição e a permeabilidade da membrana, causando o desenvolvimento e a progressão de muitas doenças, incluindo uma variedade de cânceros (por exemplo o da mama e da próstata)⁽¹⁶⁾.

Nas células, a estrutura dos lípidos determina a sua função e o destino metabólico⁽¹⁶⁾. Numa pessoa saudável, os lípidos são responsáveis pelo armazenamento de cerca de 99% da energia, sendo o glicogénio responsável pelo restante 1%. Os lípidos são essencialmente armazenados no tecido adiposo como triglicéridos e, estes são, posteriormente desdobrados, sendo que alguns dos ácidos gordos produzidos são libertados no sangue, constituindo os ácidos gordos livres⁽⁸⁾.

No plasma sanguíneo, exceptuando os ácidos gordos livres que viajam ligados à albumina, os lípidos são transportados em estruturas micelares esféricas denominadas lipoproteínas. As lipoproteínas plasmáticas contêm, no seu interior, lípidos hidrofóbicos (triacilgliceróis e ésteres de colesterol) e, no exterior, em monocamada, lípidos anfipáticos (fosfolípidos e colesterol) associados a proteínas (apolipoproteínas)⁽¹⁸⁾.

As lipoproteínas plasmáticas costumam ser classificadas de acordo com a sua densidade: por ordem decrescente temos as HDL (lipoproteínas de alta densidade), as LDL (lipoproteínas de baixa densidade), as IDL (lipoproteínas de densidade intermédia; também são designadas de VLDL remanescentes), as VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade) e os quilomicra. Esta ordem também reflete o seu tamanho relativo: as lipoproteínas mais pequenas são as HDL e as maiores os quilomicra. Quanto maior é a percentagem de proteínas e menor a de

triacilgliceróis maior é a sua densidade e menor o seu tamanho. As lipoproteínas mais ricas em triacilgliceróis são os quilomicra e, logo a seguir, as VLDL. As LDL e as HDL são muito pobres em triacilgliceróis e ricas em colesterol e ésteres de colesterol⁽¹⁸⁾. O metabolismo dos ácidos gordos dá-se por beta-oxidação⁽⁸⁾.

1.1.2.1. Beta-oxidação

A beta-oxidação dos ácidos gordos ocorre na matriz mitocondrial e constitui uma série de reações nas quais são removidos, de cada vez, dois átomos de carbono da extremidade da cadeia do ácido gordo para formar acetil-CoA⁽⁸⁾.

Consideram-se então as seguintes etapas⁽⁹⁾:

- Ativação em acil-CoA;
- Entrada do acil-CoA nas mitocôndrias;
- Oxidação;
- Início de outro ciclo de oxidação.

Embora a oxidação de ácidos gordos saturados de cadeia longa ocorra com uma química que é a mesma da oxidação de ácidos gordos saturados de cadeia média e cadeia curta, existem diferentes conjuntos de enzimas envolvidos⁽¹⁹⁾.

Os ácidos gordos saturados com número par de carbonos começam então por serem transformados na sua forma ativa (acil-CoA), sendo esta reação catalisada pela acil-CoA sintetase. Esta reação extramitocondrial, necessita de ATP, formando-se o intermediário aciladenilato. Para conseguir atravessar as mitocôndrias, o acil-CoA combina-se com a carnitina para formar acilcarnitina (libertando a CoA), sendo esta reação catalisada pela aciltransferase I (CAT I). Já dentro da mitocôndria, a CAT II catalisa a hidrólise da acilcarnitina, libertando o acil-CoA e regenerando a carnitina⁽⁹⁾. Este processo está representado na **Figura 1.4**.

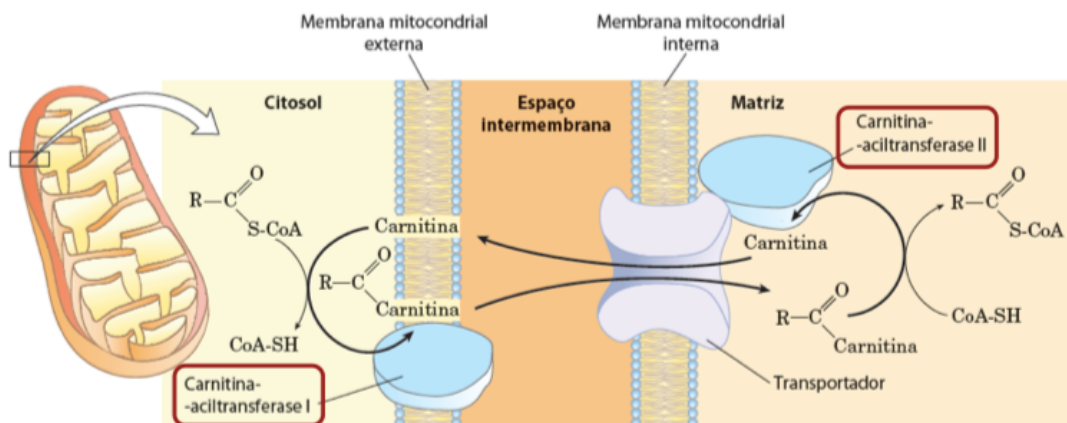


Figura 1.4 - Ativação dos ácidos gordos de cadeia longa (mais de 12 carbonos) (adaptado de ⁽²⁰⁾)

Segue-se então o processo de oxidação que consiste na remoção sequencial de unidades com dois carbonos por oxidação do carbono β do acil-CoA. A oxidação é constituída por quatro reações: primeira oxidação, hidratação, segunda oxidação e tiólise. Estas etapas encontram-se representadas na **Figura 1.5**⁽⁹⁾.

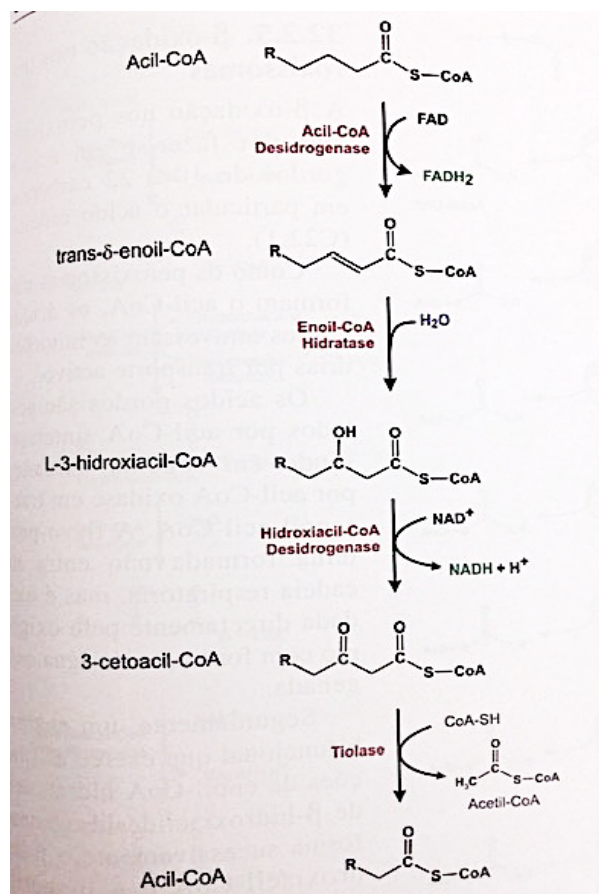


Figura 1.5 - β -oxidação dos ácidos gordos (adaptado de ⁽⁹⁾)

O acil-CoA menor volta a repetir o ciclo da β -oxidação, sendo possível uma degradação total em acetil-CoA (**Figura 1.6**)⁽¹⁹⁾.

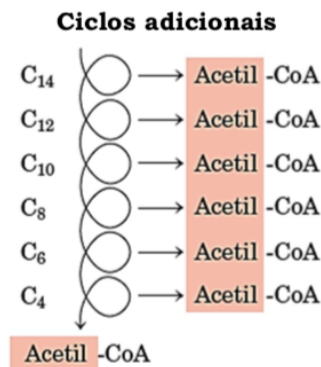


Figura 1.6 - Ciclos adicionais do acil-CoA (hélice de Lynen)
Representação da β -oxidação em que cada espiral da hélice corresponde a um encurtamento de 2 átomos de carbono no ácido gordo, libertados na forma de acetil-CoA (adaptado de⁽²⁰⁾)

1.1.2.2. Cetogénese

O acetil-CoA é também utilizado na cetogénese (formação de corpos cetónicos). Quando é produzida uma grande quantidade de acetil-CoA no fígado, nem toda entra no ciclo do ácido cítrico (TCA). Ao invés, dá-se a combinação de duas moléculas de acetil-CoA para formarem uma molécula de ácido acetoacético que é convertido, maioritariamente, em ácido β -hidroxibutírico e numa pequena quantidade de acetona. Estes três compostos constituem os corpos cetónicos, que são libertados no sangue⁽⁸⁾.

A cetogénese ocorre nas mitocôndrias, permitindo que esse processo seja intimamente acoplado à taxa de oxidação hepática dos ácidos gordos. Por outro lado, a utilização de cetonas (cetólise) ocorre no citosol⁽¹⁹⁾. O fígado converte ácidos gordos em corpos cetónicos que viajam para outros órgãos através do sangue, sendo este processo especialmente importante quando a glicose no sangue de um indivíduo diminui e esses corpos cetónicos devem manter uma fonte de energia para órgãos como o cérebro⁽²¹⁾. O acetoacetato pode ser convertido em 3- β -hidroxibutirato pela 3- β -hidroxibutirato desidrogenase ou pode sofrer descarboxilação espontânea dando origem a acetona⁽¹⁹⁾. A acetona e o 3- β -hidroxibutirato convertem-se no acetoacetato por carboxilação e oxidação, respetivamente. O ácido acetoacético é catabolizado pela acetato-succinil-CoA transferase, que catalisa a combinação do acetoacetato com o succinil-CoA para dar succinato e acetoacetil-CoA⁽⁹⁾. A acetil-CoA pode ser transformada em

citrato e usada através do TCA para produzir FADH_2 e NADH ou pode ser convertida em oxaloacetato e usada na gluconeogênese⁽²¹⁾. A cetogênese está representada na **Figura 1.7**.

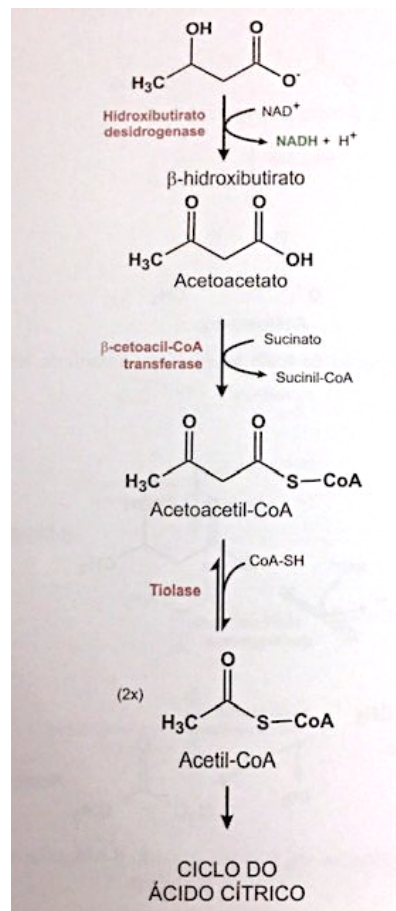


Figura 1.7 - Via da cetogênese (adaptado de⁽⁹⁾)

1.2. Obesidade

A obesidade, que constitui um problema de saúde pública considerável, é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença em que o excesso de gordura corporal acumulada pode atingir graus capazes de afetar a saúde. O excesso de gordura resulta de sucessivos balanços energéticos positivos, em que a quantidade de energia ingerida é superior à quantidade de energia dispendida⁽²²⁾.

Isto ocorre principalmente em culturas urbanizadas nas quais a atividade física diminuiu e os alimentos com alto teor de gordura e calorias se tornaram mais comuns e acessíveis. Existem vários fatores que podem levar ao desenvolvimento da obesidade. Esses fatores incluem genética, atividade física insuficiente (sedentarismo) e consumo excessivo de calorias⁽²³⁾.

A obesidade é, assim, uma doença crónica, com génese multifatorial, que requer esforços continuados para ser controlada, constituindo uma ameaça para a saúde. A prevalência da obesidade na população portuguesa adulta tem sido avaliada através do Índice de Massa Corporal (IMC)⁽²²⁾.

O IMC correlaciona o peso corporal com os riscos para a saúde, com base no cálculo da relação entre a altura e o peso. É um método desenvolvido pela OMS utilizado para determinar a presença de excesso ponderal ou desnutrição. Segundo a OMS, o IMC normal encontra-se entre 18,5 e 24,9 Kg/m² e os intervalos definidos são baseados no efeito que o peso corporal tem na saúde (**Tabela 1.1**)⁽²⁴⁾.

Tabela 1.1 - ÍMC e respetiva classificação
(adaptado de⁽²⁴⁾)

IMC	Classificação
<18,5	Baixo peso
18,5 - 24,9	Peso Normal
25,0 - 29,9	Pré-obesidade
30,0 - 34,9	Obesidade Grau I
35,0 - 39,9	Obesidade Grau II
>40,0	Obesidade Grau III

O aumento do IMC representa um aumento do risco de desenvolvimento de várias doenças⁽²⁴⁾. Quase 40% dos adultos no mundo têm um índice de massa corporal que os qualifica como excesso de peso e 13% como afetado pela obesidade⁽²⁵⁾. Em 2014, mais de metade (52,8%) da população portuguesa com 18 anos ou mais tinha excesso de peso. O aumento da obesidade foi o mais expressivo, tendo afetado principalmente as mulheres e a população com idades entre 45 e 74 anos⁽²⁶⁾.

A OMS considerou a obesidade como uma epidemia, afetando a longevidade e a qualidade de vida. O excesso de peso e a obesidade levam a um importante aumento do risco cardiovascular, por favorecerem doenças como a DM2, hipertensão arterial (HA) e dislipidemia⁽²⁷⁾.

A insulina, sendo uma hormona anabólica, medeia a conversão pós-prandial de lípidos e glicose em formas de armazenamento e, um aumento da ação da insulina, promove o ganho de gordura corporal⁽²⁵⁾.

A importância de compreender a relação entre a obesidade e a DM2 prende-se com o facto de a obesidade ser o principal fator de risco para a doença⁽²⁸⁾.

1.2.1. Tecido Adiposo

O tecido adiposo (AT) desempenha funções fisiológicas significativas, razão pela qual o seu excesso no corpo resulta em estados patológicos em muitos dos seus órgãos e sistemas. O AT é um importante órgão endócrino onde os sinais enviados de diferentes tecidos são gerados e integrados. O AT é morfológica e fisiologicamente diferenciado. Porém, devido à sua plasticidade, os adipócitos podem sofrer uma transformação e alterar a sua estrutura e metabolismo dependendo do estado fisiológico do organismo e das condições às quais ele está exposto⁽²⁹⁾. É essa plasticidade que torna o AT um órgão essencial para manter a homeostase metabólica durante os momentos em que os alimentos são abundantes ou escassos. A capacidade do AT de se remodelar rapidamente é o resultado da resposta coordenada dos tipos de células residentes do AT: adipócitos, células imunes, células endoteliais e fibroblastos. Quando a disponibilidade de nutrientes é excessiva, os adipócitos armazenam várias espécies de lípidos em forma de gotículas, que se expandem rapidamente. A expansão do tecido AT de uma forma excessiva é um dos principais contribuintes para os distúrbios metabólicos sistêmicos que são característicos da obesidade e da diabetes tipo 2⁽³⁰⁾. O AT nos mamíferos é constituído pelo tecido adiposo branco (WAT) e pelo tecido adiposo castanho (BAT).

O WAT apresenta funções mais abrangentes⁽³¹⁾. É o principal tecido de armazenamento de gordura dos mamíferos⁽³²⁾ para armazenar o excesso de energia sob a forma de triglicéridos (TG)⁽³³⁾. Além disso, o WAT oferece proteção mecânica contra choques e traumatismos externos. Pela sua distribuição mais abrangente, incluindo derme e tecido subcutâneo e por ser um excelente isolante térmico, tem também um papel importante na manutenção da temperatura corporal⁽³¹⁾.

O BAT é o principal tecido onde ocorre termogênese em mamíferos. Nos processos termogénicos que são desencadeados no BAT⁽³⁴⁾ uma quantidade significativa de energia armazenada como gordura e glicogénio é convertida em calor em vez de ser eficientemente convertida em ATP⁽³⁵⁾.

Os adipócitos castanhos distinguem-se dos adipócitos brancos por um alto número de mitocôndrias contendo a proteína-1 desacopladora (UCP1)⁽³²⁾. A termogênese ocorre por meio desta proteína específica que desacopla fisiologicamente a cadeia respiratória⁽³⁴⁾.

Em resposta à ativação do sistema nervoso simpático desencadeada por frio ou excesso de alimentação, a atividade termogénica do BAT é induzida por meio de processos celulares distintos. Ocorre a rápida ativação da UCP1 existente e a indução transcripcional dos genes que codificam a UCP1 para sustentar a oxidação e a termogênese. Outro fenómeno derivado da exposição prolongada ao frio é o chamado “escurecimento” do WAT. Este é o processo pelo

qual os adipócitos castanhos (expressando UCP1) aparecem em locais anatómicos característicos do WAT,⁽³⁴⁾ denominando-se então por adipócitos beges. Os adipócitos castanhos e beges são estrutural e funcionalmente semelhantes e são chamados coletivamente de adipócitos termogénicos⁽³²⁾.

Um estudo mostrou que a atividade do BAT foi significativamente menor em homens com excesso de peso ou obesos do que em homens magros⁽³⁶⁾. Outros estudos com modelos animais de roedores indicaram que a atividade termogénica do BAT pode proteger contra a obesidade⁽³⁴⁾. Isto leva a acreditar que, de facto, aumentando a termogénese do BAT existe um aumento do gasto energético, podendo ser uma arma poderosa contra a obesidade.

Assim sendo, ao compreender os processos biológicos que controlam a atividade e a diferenciação dos adipócitos pode ajudar-se na concepção de estratégias focadas no AT para aumentar o gasto de energia e lutar contra a obesidade⁽³⁴⁾.

1.3. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crónica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente (hormona que regula a glicose no sangue) ou quando o corpo não consegue usar efetivamente a insulina que produz e, frequentemente, existe combinação destes dois fatores^(37,38). Desta forma, há um aumento excessivo da glicémia, designado por hiperglicémia⁽³⁸⁾. A longo prazo, a hiperglicémia está associada a danos no corpo e a falhas de vários órgãos e tecidos⁽³⁹⁾.

A Pré-Diabetes é uma condição em que os indivíduos têm níveis de glicose no sangue superiores ao normal, não sendo, contudo, suficientemente elevados para serem classificados como Diabetes. As pessoas com pré-diabetes podem ter Anomalia da Glicemia em Jejum (AGJ) ou Tolerância Diminuída à Glicose (TDG) ou ambas as condições simultaneamente⁽⁴⁰⁾.

Existem diversos tipos de diabetes, sendo os mais comuns⁽⁴¹⁾:

- Diabetes Tipo 1 (DM1);
- Diabetes Tipo 2 (DM2);
- Diabetes Gestacional (DG).

A DG é definida como um distúrbio de tolerância à glicose que é descoberto pela primeira vez durante a gravidez⁽⁴²⁾. A ocorrência de DM antes da 20ª semana de gestação não indica DG, mas sim um manifesto de DM de pré-concepção⁽⁴¹⁾. Assim sendo, DG é a diabetes

diagnosticada no segundo ou terceiro trimestre de gravidez⁽⁴³⁾. A diabetes gestacional deve cessar depois do parto⁽⁴⁴⁾.

Com o passar dos anos, os diabéticos podem vir a desenvolver uma série de complicações em vários órgãos do organismo. Cerca de 40% das pessoas com diabetes vêm a ter complicações tardias da sua doença⁽⁴⁵⁾. Por esta razão, esta patologia requer atenção médica a longo prazo para limitar o desenvolvimento dessas complicações devastadoras e para monitorizá-los quando ocorrerem⁽³⁷⁾.

De um modo geral pode dividir-se as complicações em⁽⁴⁵⁾:

- Microvasculares (lesões dos vasos sanguíneos pequenos): retinopatia, nefropatia e neuropatia
- Macrovasculares (lesões dos vasos sanguíneos grandes): doença coronária, doença cerebral, doença arterial dos membros inferiores e hipertensão arterial
- Neuro, macro e microvasculares (incluem alterações de vasos sanguíneos pequenos, grandes e de nervos): pé diabético
- Outras complicações: disfunção sexual, infeções etc.

A DM esteve na origem de 4,3% das mortes ocorridas em 2013 em Portugal, representando cerca de 80% dos óbitos por doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas. Neste mesmo ano, os óbitos causados por esta doença atingiram 4 546 mil pessoas, dos quais 58% eram mulheres (2 636 óbitos). O Alentejo e a Região Autónoma dos Açores foram as regiões mais afetadas, com mais de 60 óbitos por 100 mil habitantes⁽⁴⁶⁾. Em 2018 os óbitos causados pela DM em Portugal atingiram 4 292 pessoas, sendo que 57% eram mulheres (2 464 óbitos)⁽⁴⁷⁾.

Os critérios de diagnóstico de DM, de acordo com a OMS, estão apresentados nas **Tabelas 1.2 e 1.3.**

Tabela 1.2 - Valores de glicemia plasmática normal
(adaptado de⁽⁴⁰⁾)

Valores de glicemia plasmática (Normal)

Glicemia (em jejum) ≥ 70 e < 110 mg/dl

Tabela 1.3 - Valores de glicemia plasmática na DM
(adaptado de⁽⁴⁰⁾)

Valores de glicemia plasmática (Diabetes)

Glicemia em jejum ≥ 126 mg/dl (em duas ocasiões)

Glicemia a qualquer hora ≥ 200 mg/dl (em duas ocasiões)

AGJ – Glicemia em jejum ≥ 110 mg/dl e < 126 mg/dl

TDG – Glicemia 2 horas após a ingestão de 75 gr de glicose ≥ 140 mg/dl e < 200 mg/dl

Em Março de 2012, o Parlamento Europeu solicitou à Comissão e aos Estados Membros que adotassem estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento da diabetes⁽⁴⁶⁾.

A prevenção da DM requer a adoção de estilos de vida saudáveis, tais como a prática de atividade física regular; a realização de uma alimentação variada, equilibrada e completa; não fumar; moderar o consumo de álcool e controlar o peso⁽⁴⁸⁾.

Exames regulares (como por exemplo análises de sangue) também podem ajudar a evitar complicações, por meio da detecção precoce e tratamento eficaz⁽⁴⁹⁾.

1.3.1. Pâncreas e insulina

O pâncreas (**Figura 1.8**) é um órgão alongado e delgado⁽⁵⁰⁾ que fica situado no abdômen superior, atrás do estômago e faz parte do sistema gastrointestinal⁽⁵¹⁾. O lado direito do pâncreas é chamado de cabeça e é a parte mais larga do órgão, ficando na curva do duodeno. O lado esquerdo é designado por corpo do pâncreas e é o lado mais afilado, estendendo-se levemente para cima, terminando próximo do baço, sendo designado por cauda⁽⁵⁰⁾.

Este órgão é composto por duas glândulas distintas: a exócrina que sintetiza enzimas digestivas que são secretadas numa rede de ductos que se unem ao ducto pancreático principal, percorrendo toda a extensão do pâncreas. Quando estas enzimas digestivas entram no duodeno, são ativadas, com o propósito de quebrar HC, lípidos, proteínas e ácidos⁽⁵⁰⁾. Os componentes exócrinos compreendem mais de 95% da massa pancreática⁽⁵¹⁾. A outra glândula é a endócrina,

composta por ilhotas de Langerhans, que secreta hormonas como insulina e glucagon, diretamente na corrente sanguínea, regulando os níveis de glicose e, ainda, somatostatina, que impede a libertação de insulina e glucagon⁽⁵⁰⁾. Os ilhotas compreendem 1-2% da massa pancreática⁽⁵¹⁾.

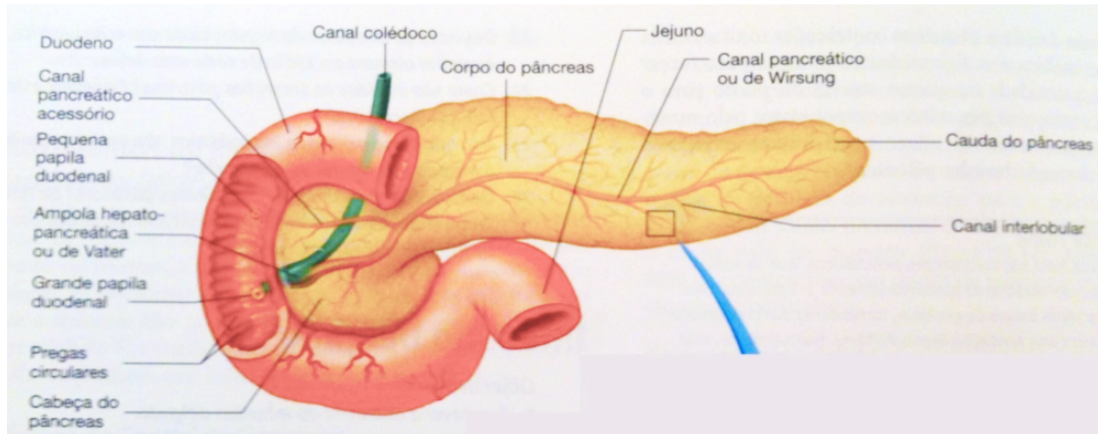


Figura 1.8 - Pâncreas
(adaptado de⁽⁸⁾)

Um adulto possui cerca de 500.000 a 1 milhão de ilhotas no pâncreas sendo estas constituídas por vários tipos de células: células β (produtoras de insulina), células α (produtoras de glucagon), células δ (produtoras de somatostatina) e células PP (produtoras de polipéptido pancreático)⁽⁵¹⁾.

A insulina é uma hormona peptídica endócrina⁽⁵²⁾ produzida pelo pâncreas⁽³⁹⁾, que liga os recetores ligados à membrana plasmática nas células-alvo, para orquestrar uma resposta analógica integrada à disponibilidade de nutrientes⁽⁵²⁾.

A insulina é um polipéptido constituído por uma sequência de 51 aminoácidos, contendo a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos, ligadas por pontes dissulfídicas. Tem um peso molecular de 5802 e o seu ponto isoelétrico é pH 5,5. A cadeia A possui uma hélice N-terminal ligada a uma hélice C-terminal anti-paralela; a cadeia B possui um segmento helicoidal central. As duas ligações dissulfídicas unem as hélices N e C-terminais da cadeia A à hélice central da cadeia B⁽⁵³⁾.

Todos os alimentos com HC são divididos em glicose no sangue. A insulina promove a entrada da glicose nas células⁽³⁹⁾.

O papel da insulina na homeostase da glicose é tipificado pelos efeitos diretos da insulina no músculo esquelético, fígado e adipócitos brancos. Estes tecidos desempenham papéis distintos na homeostase metabólica, necessitando de vias de transdução de sinal de insulina específicas para o tecido. Por exemplo, no músculo esquelético, a insulina promove a utilização

e o armazenamento de glicose, aumentando o transporte de glicose e a síntese de glicogénio. No fígado, a insulina ativa a síntese de glicogénio, aumenta a expressão génica lipogénica, e diminui a expressão génica gluconeogénica. No tecido adiposo branco, a insulina suprime a lipólise e aumenta o transporte da glicose e a lipogénese⁽⁵²⁾.

A insulina é transcrita e expressa nas células β do pâncreas, de onde é exportada pela circulação portal para o fígado. Durante esta primeira passagem mais de 50% da insulina é eliminada pelos hepatócitos no fígado. A insulina remanescente sai do fígado pela veia hepática, onde segue a circulação venosa para o coração. A insulina é distribuída para o resto do corpo através da circulação arterial, promovendo a vasodilatação. A insulina arterial exerce as suas ações metabólicas no fígado e é eliminada (através da segunda passagem). A insulina sai da circulação no nível da microvasculatura, atingindo as células musculares e adiposas, onde estimula a translocação do GLUT4 e a captação de glicose (**Figura 1.9**)⁽⁵⁴⁾.

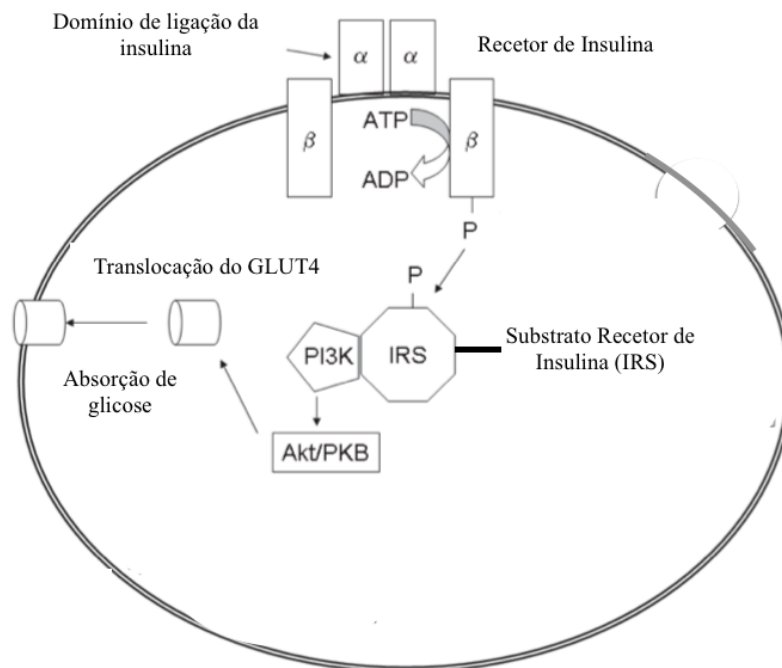


Figura 1.9 - Ação da insulina nas células
(adaptado de⁽⁵³⁾)

A restante insulina circulante é libertada e, finalmente, degradada pelo rim⁽⁵⁴⁾. Este trajeto da insulina pelo organismo pode ser observado na **Figura 1.10**:

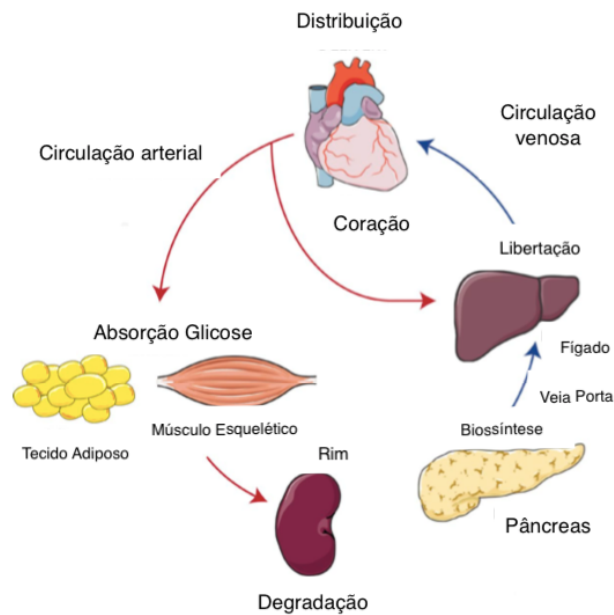


Figura 1.10 - Trajeto da insulina no organismo (adaptado de⁽⁵⁴⁾)

O transporte da glicose para o interior das células é feito por proteínas específicas designadas transportadores de glicose (GLUTs). Este transporte é feito através da membrana plasmática por meio de um mecanismo de difusão facilitada⁽⁵⁵⁾.

O GLUT2 é expresso principalmente nas células beta do pâncreas, fígado e rim. Este transportador, na membrana dos hepatócitos, regula a entrada e saída de glicose, e, como tal, controla o metabolismo hepático da glicose. Já nas células intestinais com a borda em forma de escova e nas células dos túbulos renais, o GLUT2 está associado à absorção e reabsorção da glicose⁽⁵⁵⁾.

O GLUT4 é um transportador de glicose que responde à insulina e é encontrado no coração, músculo esquelético, tecido adiposo e cérebro. Está presente no citoplasma das células em vesículas a partir das quais é translocado para a membrana plasmática sob a influência da insulina. Esse recrutamento de GLUT4 direcionado à insulina resulta num aumento de 10 a 20 vezes no transporte de glicose⁽⁵⁵⁾.

Em resposta ao estímulo da glicose, a secreção de insulina é caracteristicamente bifásica, constituída por uma fase inicial rápida de secreção, seguida por uma fase menos intensa, mas com uma liberação mais sustentada da hormona⁽⁵³⁾.

A fase inicial da secreção de insulina mediada pela glicose, caracteriza-se pela libertação de insulina dos grânulos secretores na célula β ⁽⁵³⁾. A glicose é transportada para o interior da célula β por uma proteína integral de membrana, denominada GLUT2. Esta proteína permite que o transporte de glicose aumente rapidamente quando há uma elevação da glicémia⁽⁵⁶⁾. Após a entrada da glicose na célula β , esta é detectada pela enzima glicoquinase de baixa afinidade⁽⁵³⁾ e pela hexoquinase I de alta afinidade. No entanto, esta última, é fortemente inibida pela glicose-6-fosfato (G6P), transferindo para a glicoquinase o papel fundamental na fosforilação da glicose⁽⁵⁶⁾, gerando ATP⁽⁵³⁾. Desta forma, a fração ATP/ADP aumenta no citoplasma⁽⁵⁶⁾, provocando o fecho dos canais de potássio com a consequente despolarização da membrana celular e ativação de canais de cálcio sensíveis à voltagem, levando a um aumento da concentração intracelular de cálcio. Isto desencadeia a secreção pulsátil de insulina⁽⁵³⁾.

Na **Figura 1.11** observa-se o ciclo de tempo bifásico da secreção de insulina estimulada pela glicose.

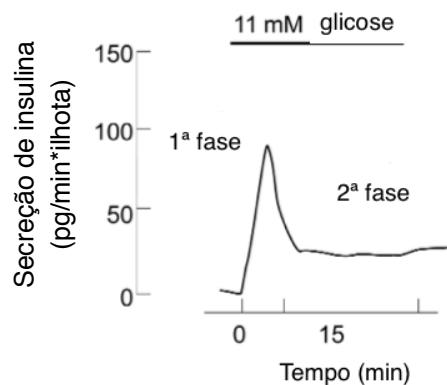


Figura 1.11 - Perfil da secreção de insulina induzida por glicose
A glicose foi elevada para 11 mM, como indicado pela barra horizontal. Presença de uma primeira fase rápida (com duração de ~ 10 min) e uma segunda fase mais lenta. (adaptado de⁽⁵⁷⁾)

Logo após a elevação da concentração de glicose, é observada uma estimulação transitória da secreção de insulina, denominada por “primeira fase”, que tem uma duração de cerca de 10 minutos. Posteriormente, esta primeira fase é seguida por uma estimulação secundária que se desenvolve gradualmente, denominada por “segunda fase”⁽⁵⁷⁾.

1.3.1.1. Via da sinalização da insulina InsR/PI3K/AKT/FOXO

A via de sinalização insulínica fornece informações importantes sobre o estado nutricional de um organismo. De entre os componentes da via de sinalização da insulina, as proteínas *Forkhead box O* (FOXO) desempenham um papel importante na patogênese da resistência à insulina e do cancro⁽⁵⁸⁾. As proteínas FOXO podem regular uma variedade de genes que influenciam a proliferação celular, sobrevivência, metabolismo e resposta ao *stress*⁽⁵⁹⁾.

Os fatores de transcrição FOXO são os principais alvos da ação da insulina e pensa-se que a desregulação da função FOXO promove o desenvolvimento de diabetes *mellitus*⁽⁶⁰⁾. Estudos mostram que em modelos *Mus musculus* com *knockout* específico para o fígado, onde a sinalização da insulina é interrompida no fígado, indicam que FOXO1, a principal proteína FOXO expressa no fígado, desempenha um papel crítico na capacidade de manutenção da insulina em regular a homeostase da glicose e regular a produção de glicose hepática por meio de mecanismos intra-hepáticos e extra-hepáticos⁽⁶⁰⁾.

As FOXO são fatores de transcrição regulados negativamente pela sinalização da insulina via fosforilação mediada por AKT e constituem um dos principais efetores transcripcionais dessa via⁽⁵⁸⁾. Na membrana celular, os sinais de insulina são recebidos através de recetores de tirosina quinase (InsR), para assim ativar uma cascata de respostas intracelulares metabólicas e mitogénicas, sobretudo mediadas pela ativação de fosfoinosítídeo quinase (PI3K) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), respetivamente. Mutações nos membros da via InsR/PI3K/AKT/FOXO têm sido associadas à resistência à insulina e diabetes, entre outros distúrbios. A via de sinalização PI3K/AKT é uma das vias de sinalização mais frequentemente ativadas no cancro humano⁽⁵⁸⁾. AKT é uma proteína quinase serina-treonina que está implicada na sinalização de sobrevivência numa ampla variedade de células, incluindo células fibroblásticas, epiteliais e neuronais. A hiperativação de AKT está associada à resistência à apoptose, aumento do crescimento celular, proliferação celular, metástase e metabolismo de energia celular⁽⁶¹⁾.

A alteração da sinalização da insulina está então envolvida no desenvolvimento de várias patologias, tais como diabetes, obesidade e cancro. É importante referir que os pacientes que sofrem de obesidade e diabetes têm um risco acrescido de desenvolver vários tipos de cancro, incluindo o da mama, colorrectal, fígado e pâncreas. Também a hiperglicémia está correlacionada com a baixa sobrevivência em pacientes com vários tipos de cancro e a hiperinsulinémia relacionada com a obesidade foi indicativa em promover a proliferação celular, suprimir a apoptose, levando à iniciação e proliferação do tumor⁽⁵⁸⁾.

1.3.2. Diabetes tipo 1

A Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) (anteriormente conhecida como diabetes insulino-dependentes, juvenil ou de infância)⁽³⁷⁾, geralmente ocorre de repente⁽⁶²⁾ e é caracterizada pela produção deficiente de insulina no organismo. As pessoas portadoras deste tipo de diabetes requerem administração diária de insulina para regular a quantidade de glicose no sangue⁽³⁷⁾.

A DM1 é um distúrbio heterogêneo caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas, culminando em deficiência absoluta de insulina. A maioria dos casos é atribuível à destruição autoimune de células beta (tipo 1a), embora uma pequena minoria de casos resulte da destruição idiopática ou falha das células beta (tipo 1b)⁽⁶³⁾. Este tipo de diabetes pode desenvolver-se em qualquer idade, mas é a doença metabólica mais comum em crianças e jovens com incidência aumentada em 2-5% em todo o mundo. A incidência mais alta (>20/100.000 por ano), foi relatada na Sardenha, Finlândia, Suécia, Noruega, Portugal, Reino Unido, Canadá e Nova Zelândia⁽⁶⁴⁾.

Os sintomas iniciais normalmente aparecem de forma súbita e incluem micção excessiva e sede extrema⁽³⁷⁾. Isto acontece devido ao aumento da glicose no sangue, fazendo com que os rins criem mais urina do que o habitual. A consequência será a pessoa ficar desidratada, levando a um aumento da sede⁽⁶⁵⁾. Outros sintomas incluem perda de peso e fome constante⁽³⁷⁾. A perda de peso pode dever-se, em parte, à desidratação⁽⁶⁵⁾. Além disso, podem ocorrer fraqueza, fadiga, confusão, náuseas e vômitos. Estes sintomas podem ser causados por desidratação e cetoacidose⁽⁶⁵⁾.

A cetoacidose ocorre quando as concentrações de insulina são insuficientes para suprir as necessidades metabólicas básicas do organismo⁽⁶⁶⁾. Desta forma, o corpo pode usar cetonas como fonte alternativa de energia, na ausência de HC⁽²¹⁾. A cetoacidose pode causar problemas cardíacos e afetar o sistema nervoso, colocando a pessoa, em poucas horas, em risco de coma⁽⁶⁵⁾.

Para além dos sintomas iniciais podem ocorrer sintomas crónicos, mesmo depois de diagnosticado e iniciado o tratamento, se os níveis de glicose no sangue não forem bem controlados. Alguns desses sintomas/complicações incluem lesões oculares (retinopatia), pé diabético, danos nos nervos (neuropatia), doença renal (nefropatia), doenças cardíaca e arterial e hipoglicémia. A hipoglicémia pode resultar de tratamentos para diminuir a glicose ou se alguma refeição for ignorada. Os sintomas da hipoglicémia incluem: fraqueza, tontura, tremor, sudorese súbita, dor de cabeça, confusão, irritabilidade, visão turva ou dupla. Se a hipoglicémia não for corrigida poder levar ao coma⁽⁶⁵⁾.

Ainda em relação ao pé diabético, esta é uma das complicações mais frequentes na diabetes e é responsável pela maioria das amputações em Portugal⁽⁴⁵⁾.

1.3.3. Diabetes tipo 2

Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (anteriormente chamada de diabetes não-insulino-dependente ou do adulto)⁽³⁷⁾ geralmente leva mais tempo para se desenvolver. Pode começar a qualquer momento desde a infância⁽⁶²⁾. Esta patologia consiste numa série de disfunções caracterizadas por hiperglicémia e resultantes da combinação de resistência à ação da insulina, secreção inadequada de insulina e secreção excessiva ou inadequada de glucagon. A DM2 mal controlada está associada a uma série de complicações microvasculares, macrovasculares e neuropáticas⁽⁶⁷⁾.

A DM2 é uma paracrinopatia da ilhota, na qual se perde a relação recíproca entre a célula alfa secretora de glucagon e a célula beta secretora de insulina, levando à hiper glucagonemia e, conseqüentemente, à hiperglicémia resultante. Esta patologia é caracterizada por uma combinação de resistência periférica à insulina e secreção inadequada de insulina pelas células beta pancreáticas⁽⁶⁷⁾.

A resistência à insulina, que pode ser definida como um estado de resposta reduzida aos níveis circulantes normais de insulina⁽¹⁾, foi atribuída a níveis elevados de ácidos gordos livres e citocinas pró-inflamatórias no plasma, levando à diminuição do transporte de glicose para as células musculares, à produção elevada de glicose hepática e ao aumento da quebra de gordura. Para que a DM2 ocorra, é necessário que exista resistência à insulina e secreção inadequada de insulina⁽⁶⁷⁾.

A DM2 é cada vez mais comum nas crianças à medida que a obesidade infantil se tornou epidémica. Cerca de 90% dos adultos com DM têm o tipo 2⁽⁶⁸⁾.

O ganho de peso e a obesidade são os fatores de risco mais fortes para DM2⁽³⁷⁾. Para além disso, o sedentarismo, o envelhecimento populacional e a predisposição genética são também fatores de risco⁽⁶⁹⁾. Dos dois tipos de diabetes, o tipo 2 tem um componente genético mais forte do que o tipo 1⁽²³⁾.

Muitos dos sintomas da DM2 são idênticos aos da DM1, embora menos severos⁽⁷⁰⁾. Para além dos sintomas semelhantes aos da DM1, os doentes podem apresentar hiperglicémia sintomática, mas em geral são assintomáticos e a sua condição só é detetada durante exames de rotina⁽⁶⁸⁾. Pode ocorrer formigueiro, dor ou dormência nas mãos e nos pés⁽⁷⁰⁾.

Quem tiver uma participação ativa na gestão da sua diabetes, está a fazer progressos na diminuição de riscos de problemas relacionados com a diabetes⁽⁴⁹⁾.

1.4. FOXO

Os fatores de transcrição FOXO são um subgrupo de uma superfamília de proteínas *Forkhead*. A principal característica desta superfamília de proteínas é que elas contêm um domínio proteico conservado, *forkhead box*, que consiste em cerca de 100 resíduos de aminoácidos que se ligam ao DNA de genes alvo⁽⁷¹⁾.

Foram identificados 4 membros desta subfamília: FOXO1 (FKHR), FOXO3 (FOXO3a), FOXO4 (AFX) e FOXO6⁽⁵⁸⁾.

Os mRNAs de FOXO1, FOXO3 e FOXO4 são expressos em níveis variáveis nos mamíferos. FOXO1 é altamente expresso nos tecidos adiposos e no fígado, enquanto FOXO3 se expressa num nível alto no cérebro, coração, rim e baço. Já FOXO4 é altamente expresso no músculo esquelético⁽⁷¹⁾. Inicialmente, pensava-se que FOXO6 era expresso exclusivamente no sistema nervoso central e no músculo oxidativo, no entanto, também se demonstrou aumentar após jejum nocturno no fígado, onde regula a gluconeogénese⁽⁵⁸⁾. De entre os quatro membros FOXO em células de mamíferos, FOXO6 permanece o membro menos caracterizado, em parte, devido ao equívoco de se pensar que a expressão de FOXO6 estaria confinada no cérebro. Apesar de o mRNA da FOXO6 não ser exclusiva do cérebro, sabe-se que esta se expressa em maior quantidade neste órgão, preferencialmente no hipocampo, sugerindo então um papel importante no sistema nervoso⁽⁷²⁾.

As proteínas FOXO desempenham um papel importante na sinalização insulínica e no fator de crescimento em diversas funções fisiológicas, incluindo proliferação celular, apoptose e metabolismo⁽⁷⁾. Além das suas funções clássicas na promoção da morte celular e na indução da paragem do ciclo celular, as FOXO também regulam o metabolismo do cancro⁽⁷³⁾. Assim sendo, mutações genéticas nos genes FOXO ou uma expressão anormal das proteínas FOXO estão associadas a doenças metabólicas, cancro ou longevidade alterada em humanos e animais⁽⁷²⁾.

Todos os membros da família FOXO, com exceção de FOXO6, sofrem fosforilação dependente de insulina e exclusão nuclear. A falha na fosforilação de FOXO mediada por insulina resulta em localização nuclear permanente do FOXO, responsável por uma atividade descontrolada do FOXO e uma expressão constitutiva dos genes-alvo, havendo então uma

anomalia associada à sinalização defeituosa da insulina (ou IGF-1) na patogênese de doenças como cancro e diabetes⁽⁷²⁾.

Como efetores finais da via de sinalização da insulina, as proteínas FOXO respondem em geral à diminuição de nutrientes, induzindo a gluconeogênese no fígado, inibindo a diferenciação de adipócitos e miócitos ou mudando a utilização de “combustível” no músculo de glicose para lípidos⁽⁵⁸⁾.

As proteínas FOXO desempenham também papéis importantes na proteção das células do stress oxidativo. Este efeito citoprotetor é atribuível à função antioxidante dos FOXO. Em resposta ao stress oxidativo, as proteínas FOXO sofrem translocação do citoplasma para o núcleo, contribuindo para o aumento da atividade das FOXO na promoção de genes-alvo FOXO que codificam enzimas antioxidantes, tais como expressão de superóxido dismutase de manganês, catalase e glutathione peroxidase. Esse efeito contribui para a preservação da sobrevivência e função das células face ao stress oxidativo. No entanto, o stress oxidativo crônico está também associado à apoptose celular⁽⁷²⁾.

Apesar da sua conservação estrutural no domínio das *Forkhead*, sabe-se então que a expressão das diferentes FOXOs tem especificidade tecidual, sugerindo que cada FOXO tem um papel essencial em diferentes tecidos^(71,72).

1.4.1. Regulação das FOXOs por fosforilação pela via PI3K/AKT

As proteínas FOXO possuem a característica particular da sua localização celular no citoplasma e no núcleo ser rigorosamente regulada. A transferência das FOXOs entre o citoplasma e o núcleo é facilitada através dos domínios de sinal de localização nuclear e de sinal de exportação nuclear, presentes nas FOXOs^(58,71).

Em condições de *stress* ou na ausência de fatores de crescimento ou sobrevivência, quando a via PI3K/AKT é inibida, as proteínas FOXO translocam-se para o núcleo da célula, onde as suas funções de transcrição podem ser executadas⁽⁵⁹⁾. A sinalização da insulina altera o equilíbrio da distribuição celular, ou seja, na ativação por sinais extracelulares, como a insulina ou fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), PI3K é convocada para a membrana plasmática provocando uma fosforilação para ativar a AKT e, assim, iniciar a cascata de fosforilação das FOXOs^(58,71). Foram identificados três locais de fosforilação AKT altamente conservados em proteínas FOXO, correspondendo a treonina 24, serina 256 e serina 319 no FOXO1 humano e, determinou-se que a fosforilação nesses locais é suficiente para inibir a função das proteínas FOXO⁽⁶⁰⁾. A fosforilação destes locais concebe locais de ligação para as

proteínas chaperone 14-3-3. A ligação deste tipo de proteínas nas FOXOs fosforiladas bloqueia a translocação nuclear a partir do citoplasma, no entanto, promove a exportação de FOXO do núcleo, fazendo com que haja uma diminuição da atividade dos genes induzidos pelas FOXOs. Por outras palavras, as FOXOs ficam inativadas. Desta forma, a via da insulina/PI3K/AKT é uma principal via de sinalização que regula a função das FOXOs, nomeadamente, por fosforilação, suprimindo então a sua atividade^(58,71).

Embora uma das principais quinases que fosforila as FOXOs seja o AKT ativado pela PI3K, a proteína quinase A (PKA), também fosforila a FOXO1. O péptido semelhante a glucagon 1 (Glucagon like peptide-1, GLP-1) ativa a PKA e pode fosforilar diretamente a FOXO1. Isto acontece porque o GLP-1 se liga a GLP-1Rs, recetores acoplados à proteína G, para ativar a adenilil ciclase, de forma a gerar AMP cíclico (AMPc), que liga as subunidades reguladoras da holoenzima PKA, para libertar subunidades catalíticas de PKAc. A PKA ativada fosforila as proteínas alvo, tais como a proteína responsiva ao AMPc (CRE) e proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB), seguida pelo recrutamento da histona acetiltransferase para genes proliferativos dos genes alvo, tais como a ciclina A2 e IRS2, para ativar a transcrição genética⁽⁷¹⁾.

1.5. Pseudoquinases Tribbles

As proteínas quinases são reconhecidas há bastante tempo pelos seus papéis vitais na regulação da maioria dos processos eucarióticos. No entanto, em algumas situações não estão reguladas, tais como em cancros e doenças neuro-degenerativas. O papel principal destas proteínas quinases é catalisar a transferência de um grupo fosfato do ATP para o seu substrato, um processo que é mediado por um fold de domínio da quinase altamente conservada⁽⁷⁴⁾.

O gene dos *Tribbles* (TRIBs) foi identificado pela primeira vez em 2000^(6,75), numa triagem genética que teve como objetivo identificar mutações que controlam a divisão celular e a migração celular⁽⁷⁶⁾ em *Drosophila* (mosca da fruta)^(6,75).

A família de genes TRIBs codifica proteínas pseudoquinases e, em vez da fosforilação direta das proteínas alvo, os TRIBs actuam como adaptadores nas vias de sinalização de importantes processos celulares. Isso inclui a proteína quinase quinase ativada por mitogénio (MAPKK), a proteína de ligação do intensificador de CCAAT (C/EBP), o fator de transcrição ativador 4 (ATF4) e a proteína homóloga C/EBP (CHOP). Esta família de proteínas consiste em três genes: TRIB1, TRIB2 e TRIB3⁽⁷⁵⁾. As proteínas TRIBs estão envolvidas em distúrbios não neoplásicos, incluindo doenças metabólicas e neurológicas⁽⁷⁵⁾, tais como metabolismo de

glicose e lípidos, inflamação, stress celular, sobrevivência, apoptose. Além disso, as TRIBs desempenham um papel na diferenciação de macrófagos, linfócitos, células musculares, adipócitos e osteoblastos⁽⁶⁾. A expressão diferencial das três pseudoquinases TRIB em células hematopoiéticas destaca funções não redundantes e específicas de linhagem neste sistema: TRIB1 é expresso mais elevadamente na linhagem mielóide, TRIB2 na linhagem linfóide e TRIB3 de forma consistente em todas as células hematopoiéticas. Interações entre TRIBs e fatores de transcrição C/EBP (C/EBP α , β , γ , δ , ϵ , ζ) sustentam a sua importância no desenvolvimento e diferenciação celular, uma vez que C/EBPs regulam a expressão de um espectro diverso de genes-alvo⁽⁷⁴⁾.

Os TRIBs têm um domínio N-terminal (NT), um domínio central semelhante às quinases (central kinase-like) e um domínio C-terminal (CT) de ligação à proteína. Existe uma divergência de sequência significativa no domínio N-terminal entre homólogos de TRIBs. O domínio C-terminal possui MEK1 (liga-se a MAPKK) e COP1 (liga-se a ligases de ubiquitina). O domínio da pseudoquinase é importante para interações proteína-proteína entre fatores de transcrição.⁽⁶⁾ A sua estrutura geral pode ser observada na **Figura 1.12**.

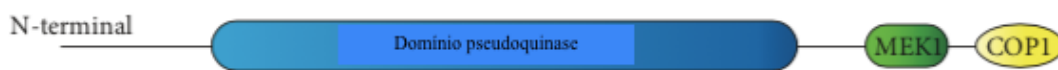


Figura 1.12 - Estrutura proteica básica das isoformas TRIB
(adaptado de⁽⁶⁾)

A família de proteínas TRIBs é então caracterizada pelo seu domínio central da pseudoquinase que é bem conservado durante a evolução⁽⁷⁵⁾. O segmento NT tem cerca de 60 a 80 resíduos na maioria dos organismos investigados, embora em algumas espécies possa ser muito mais longo. A característica mais marcante do fragmento NT é o conteúdo muito alto de serina (7 a 24%) e prolina (6 a 23%), principalmente na parte de sequência adjacente ao domínio central semelhante à quinase. Já o fragmento CT das proteínas TRIBs tem na maioria dos casos cerca de 35 a 45 resíduos de comprimento e é rico em aminoácidos carregados⁽³⁾.

A literatura e a análise evolutiva dos TRIBs sugere que as proteínas codificadas por estes genes podem desempenhar uma importante função reguladora na modulação da atividade de várias vias de sinalização e fatores de transcrição⁽³⁾. Os avanços no entendimento da família de pseudoquinases *Tribbles* revelam essas proteínas como marcadores potencialmente valiosos de diagnóstico, prognóstico, previsão e estratégia clínica da doença⁽⁷⁴⁾.

1.5.1. TRIB1

Os Tribbles-1 (TRIB1) humanos foram identificados pela primeira vez como homólogos de TRIB2, com base numa sequência parcial de cDNA. O gene humano está localizado no cromossoma 8⁽³⁾.

O TRIB1 expressa-se no fígado, rim, coração, cérebro, pele, intestino delgado, medula óssea, leucócitos do sangue periférico, especialmente monócitos, macrófagos e células B, glândula da tiróide, tecido adiposo branco e pâncreas⁽⁶⁾.

A expressão de TRIB1 aumenta nas artérias ateroscleróticas humanas com inflamação crónica e reduz a proliferação de células do músculo liso vascular e a quimiotaxia^(6,77). Além disso, TRIB1 também regula o metabolismo das lipoproteínas⁽⁷⁸⁾. O aumento da expressão hepática específica de TRIB1 reduz os TG plasmáticos e o colesterol, reduzindo a produção de VLDL, sendo que os ratinhos *knockout* para TRIB1 têm níveis de TG e colesterol elevados⁽⁷⁸⁾. Em humanos, variações nos *loci* de TRIB1 estão associadas ao aumento das lipoproteínas plasmáticas e ao risco de doença arterial coronária. Pensa-se que TRIB1 pode também desempenhar um papel na migração de macrófagos⁽⁶⁾.

Pensa-se assim, que TRIB1 desempenha um papel central na ligação entre tecido adiposo, sistema imunológico e homeostase metabólica⁽⁶⁾.

1.5.2. TRIB2

De entre a família de TRIBs de mamíferos, pouco se sabe sobre a função molecular do TRIB2. O gene humano está localizado no cromossoma 2. É uma proteína lábil e está localizada principalmente no citoplasma de vários tipos de células. A regulação da expressão desse gene (de forma semelhante aos outros TRIBs) é específica para o tipo de célula⁽³⁾.

O TRIB2 expressa-se no timo, coração, cérebro, rim, pulmão, pele, baço, leucócitos do sangue periférico (linfócitos T e B) e tecido adiposo branco⁽⁶⁾. Nas células-tronco hematopoiéticas de modelos murinos, a expressão retroviral de TRIB2 induz leucemia mielóide aguda e degradação de C/EBP α ⁽⁷⁹⁾. TRIB2 mantém as propriedades oncogénicas das células de melanoma e o *knockdown* de TRIB2 reduz a proliferação celular, a formação de colónias e a cicatrização de feridas⁽⁵⁹⁾. TRIB2 suprime a diferenciação de adipócitos inibindo AKT e C/EBP β ⁽⁸⁰⁾. A regulação negativa de TRIB2 potencia a produção de IL-8 induzida por LPS através das vias MAPK⁽⁸¹⁾.

A modulação da sinalização AKT/FOXO já foi demonstrada, embora os mecanismos moleculares ainda não sejam totalmente compreendidos. Os diferentes membros da família

TRIB parecem ter papéis diferentes nessa via, sendo que, TRIB2 aumenta a sinalização de AKT e promove a resistência a medicamentos em células cancerígenas⁽⁷⁴⁾.

As funções de TRIB2 são bastante diversas, mas pensa-se que pode desempenhar um papel na inflamação e diferenciação celular, incluindo a formação de tumores⁽⁶⁾. TRIB2 inibe FOXO (gene supressor de tumor) contribuindo para o fenótipo maligno das células do melanoma⁽⁵⁹⁾. Isto sugere que TRIB2 confere resistência ao reduzir a morte celular induzida por inibidores de PI3K/mTOR⁽⁴⁾. TRIB2 é sobre-expresso em linhas celulares de melanoma e em pacientes com melanoma⁽⁵⁹⁾. A expressão do TRIB2 correlaciona-se com o estágio da doença, sugerindo TRIB2 como um biomarcador potencial para o diagnóstico e prognóstico do melanoma⁽⁸²⁾.

1.5.3. TRIB3

TRIB3 foi, até agora, o mais estudado das isoformas de TRIBs de mamífero⁽⁶⁾. O gene humano está localizado no cromossoma 20⁽³⁾.

TRIB3 expressa-se principalmente no fígado, medula óssea, leucócitos do sangue periférico (células B), baço, timo, próstata, coração, rim, pulmão, pele, intestino delgado, tecido adiposo branco, neurónios, músculo esquelético e estômago⁽⁶⁾.

Demonstrou-se que TRIB3 inibe a fosforilação de AKT em células neuronais, levando à morte celular na doença de Parkinson⁽⁸³⁾. Há estudos que sugerem que no rim, o TRIB3 inibe citocinas e quimiocinas inflamatórias, uma vez que o TRIB3 inibe a expressão de podócitos da proteína 1 de monócitos quimiocina (MCP-1). O *knockdown* de TRIB3 em mastócitos sensibilizados aumenta a expressão de IL-6, MCP-1, TNF α e IL-4, sugerindo novamente que o TRIB3 pode diminuir a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. *In vivo*, a expressão de TRIB3 aumenta no fígado de modelos murinos em jejum e funciona para aumentar a produção de glicose. O TRIB3 é regulado positivamente no músculo esquelético de pacientes com DM2 e a expressão elevada do TRIB3 nas células musculares bloqueia o transporte de glicose estimulado pela insulina e prejudica a fosforilação do AKT. O TRIB3 afeta a absorção e a oxidação de glicose de maneira oposta nos músculos e na gordura, sendo que pode funcionar como um sensor da disponibilidade de nutrientes. A inibição do TRIB3 pode melhorar a sensibilidade à insulina *in vivo* principalmente de maneira dependente do PPAR γ , independentemente de alterações na atividade do AKT. Desta forma, o TRIB3 regula a sensibilidade à insulina e a lipólise e pode ser um excelente alvo terapêutico para a resistência à insulina.⁽⁶⁾

1.5.4. Cancro

O cancro está entre as principais causas de morte em todo o mundo e representa uma grande ameaça à saúde pública. As taxas de incidência aumentaram na maioria dos países desde 1990. Em 2013 houve 14,9 milhões de casos de cancro incidentes e 8,2 milhões de mortes no mundo⁽⁸⁴⁾.

O cancro é caracterizado pelo crescimento celular descontrolado, com aumento da proliferação e diminuição da apoptose e melhora o comportamento migratório das células, promovendo a sua capacidade de invadir tecidos adjacentes e/ou metastizar para órgãos e tecidos não adjacentes. O metabolismo lipídico anormal é reconhecido como uma das principais características das células cancerígenas porque a proliferação celular requer um aumento da biossíntese lipídica e o catabolismo lipídico produz moléculas bioativas que atuam como moléculas de sinalização para regular as metástases do cancro⁽¹⁶⁾.

Os TRIBs desempenham papéis multifatoriais em vários cancros, além de estarem ligados à resistência a medicamentos por meio de vias de sobrevivência e anti-apoptóticas. O conhecimento atual indica papéis oncogénicos e supressores de tumores da família TRIB, dependentes do membro da família e do contexto celular⁽⁷⁴⁾.

TRIB1 e TRIB2 foram identificados como oncogenes mielóides e ambos podem estar envolvidos na leucemia humana⁽⁷⁵⁾.

A via pela qual os TRIBs promovem a oncogénese é o seu papel na degradação dos fatores de transcrição C/EBP. TRIB1 e TRIB2 degradam a isoforma C/EBP α p42, resultando num excesso de P30, um mecanismo que mimetiza o que ocorre em pacientes com leucemia mielóide aguda (LMA) com mutações no C/EBP α . Esse mecanismo de degradação do C/EBP α mediado por TRIB tem um papel fundamental na patogénese e na resposta terapêutica. No cancro de sangue, demonstrou-se que a expressão elevada de TRIB2 se correlaciona diretamente com a alta expressão da proteína antiapoptótica BCL-2, que promove a sobrevivência e a quimiorresistência do tumor, promovendo a proliferação e prevenindo a apoptose⁽⁷⁴⁾.

O surgimento de células tumorais resistentes a medicamentos é um grande obstáculo. Como as proteínas FOXO desempenham um papel fundamental na ação de medicamentos contra o cancro, proteínas capazes de suprimir a atividade FOXO são fortes candidatos a conferir resistência a medicamentos. TRIB2 foi identificada como uma proteína supressora da FOXO, logo, foi também implicada no desenvolvimento e progressão de melanoma e leucemia. Um estudo sugere que o TRIB2 funciona como um componente regulador crítico da rede de sinalização PI3K, ativando o AKT nas células cancerígenas⁽⁴⁾.

Para a realização deste trabalho, surgiu então a hipótese que TRIB2 pode desempenhar um papel crucial no metabolismo celular, uma vez que é uma proteína supressora da FOXO⁽⁴⁾. As FOXO são os principais alvos da ação da insulina e a desregulação da função FOXO promove o desenvolvimento de diabetes *mellitus*⁽⁶⁰⁾. Na ausência de insulina, a FOXO1 encontra-se no núcleo celular, participando na transcrição de genes que regulam a gluconeogénese. Na presença de insulina, a proteína AKT fosforila a FOXO1 e inativa a sua atividade transcricional, deixando-a retida no citoplasma⁽⁸⁵⁾. No entanto, em pacientes diabéticos com resistência à insulina não há ativação da AKT pela insulina, logo não há inibição da FOXO pela AKT, pelo que aumenta a expressão de enzimas chave na gluconeogénese, conduzindo a hiperglicémia. Pretende-se então investigar como é que varia a expressão de TRIB2 nos diferentes tecidos metabólicos e nas diferentes condições metabólicas.

2. Objetivo

Esta investigação teve os seguintes objetivos principais:

- ✓ Avaliar os níveis de expressão de TRIB2 em tecidos metabólicos (fígado, músculo esquelético e tecidos adiposos) em resposta a condições específicas (obesidade, DM2, resistência à insulina) e estímulos (exposição ao frio, tratamento com rosiglitazona), em amostras de tecidos humanos e de modelos animais, utilizando a base de dados GEO (*Gene Expression Omnibus*).
- ✓ Avaliar a expressão génica de TRIB2 em amostras específicas (tecido adiposo branco) de modelos animais de obesidade induzida pela dieta, através da realização de PCR quantitativa.

3. Metodologia

3.1. Análise da expressão de Trib2 na base de dados GEO

A base de dados *GEO Profiles* armazena perfis de expressão génica. Cada perfil é apresentado como um gráfico (**Figura 3.1**) que exhibe o nível de expressão de um gene em todas as amostras num *DataSet* (GDS). O contexto experimental é fornecido nas barras ao longo da parte inferior dos gráficos, tornando possível ver rapidamente se um gene é diferencialmente expresso em diferentes condições experimentais⁽⁸⁶⁾.

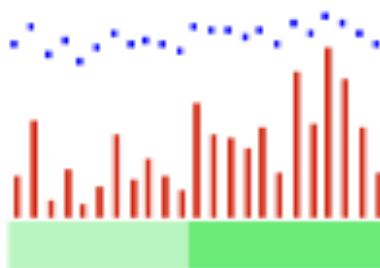


Figura 3.1 – Perfil da expressão génica
(adaptado de⁽⁸⁶⁾)

Os perfis GEO podem ser pesquisados usando características diferentes, incluindo, por exemplo, palavras-chave, símbolos de genes e/ou nomes de genes⁽⁸⁶⁾. Para análise dos perfis GEO, acedeu-se à ferramenta *GEO Profiles* da plataforma NCBI⁽⁸⁷⁾ e, na barra de pesquisa, inseriram-se as palavras-chave da informação pretendida (**Figura 3.2**).

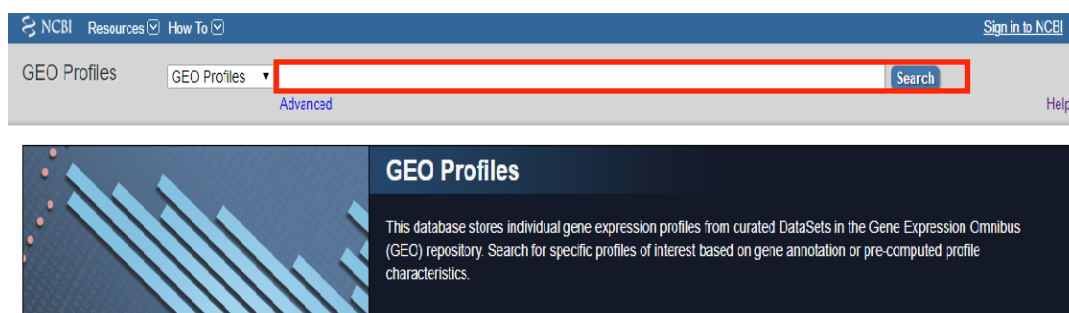


Figura 3.2 – Barra de pesquisa dos perfis GEO
(adaptado de⁽⁸⁷⁾)

As palavras-chave utilizadas foram: “TRIB2 [Gene symbol] AND (Homo sapiens [Organism] OR Mus musculus [Organism] OR Rattus norvegicus [Organism] AND (liver OR muscle OR adipose)). Outras palavras-chave utilizadas foram fast* OR fed* OR diet* OR insulin* OR obes* OR diabet* OR cold OR exercise*.

Dos resultados obtidos apenas se escolheram os mais relevantes, ou seja, aqueles que referiam TRIB2, os que envolviam os tecidos metabólicos selecionados (fígado, tecido adiposo e músculo esquelético), e em que o gráfico exibia uma alteração aparente no nível de expressão de TRIB2 nas diferentes condições experimentais mencionadas. Os resultados ficaram reduzidos para 42 estudos.

Fez-se o *download* da informação (**Figura 3.3**) que, por norma, aparece num ficheiro de texto (**Figura 3.4**).

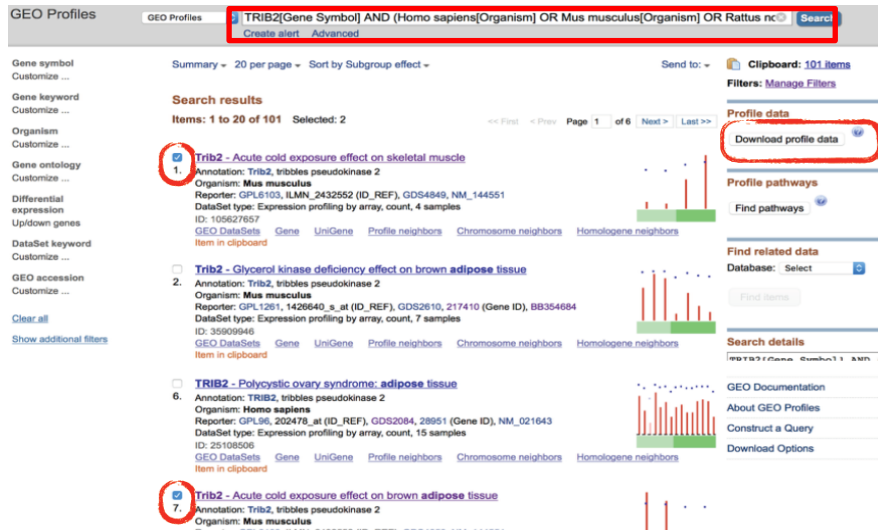


Figura 3.3 - Exemplo de uma pesquisa usando os perfis GEO (retirado de⁽⁸⁷⁾)

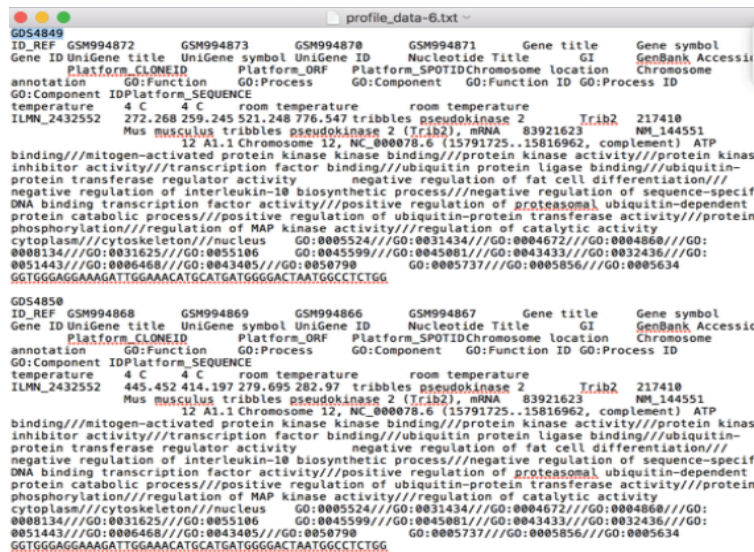


Figura 3.4 - Exemplo do *download* da informação do Perfil GEO

A informação adquirida foi transferida para um ficheiro *Excel* (**Figura 3.5**).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	GDS4849												
2	ID_REF	GSM994872	GSM994873	GSM994870	GSM994871	Gene title	Gene symbol	Gene ID	UniGene title	UniGene symbol	UniGene ID	Nucleotide Title	GI
3	temperature	4 C	4 C	room temperature	room temperature								
4	ILMN_2432552	272.268	259.245	521.248	776.547	tribbles pseudokinase 2	Trib2	217410				Mus musculus tribbles pseudokinase 2 (Trib2), mRNA	83921623
5													
6	GDS4850												
7	ID_REF	GSM994868	GSM994869	GSM994866	GSM994867	Gene title	Gene symbol	Gene ID	UniGene title	UniGene symbol	UniGene ID	Nucleotide Title	GI
8	temperature	4 C	4 C	room temperature	room temperature								
9	ILMN_2432552	445.452	414.197	279.695	282.97	tribbles pseudokinase 2	Trib2	217410				Mus musculus tribbles pseudokinase 2 (Trib2), mRNA	83921623
10													
11													
12													
13													

Figura 3.5 - Exemplo da informação dos Perfis GEO transferidos para Excel

Para os 42 estudos selecionados, calcularam-se a média, desvio padrão e normalizaram-se as amostras através do cálculo do *fold change*, permitindo observar os dados sobre a variação na expressão relativa ao respetivo controlo e avaliar os estudos, nas condições selecionadas. A significância estatística foi obtida a partir do teste t de Student bicaudal. A significância estatística está definida para um valor de $p < 0,05$. Desses 42 estudos são apresentados os resultados com valores estatisticamente significativos ou a tender para tal, exceptuando o tecido do músculo esquelético em que, apesar de não se ter obtido resultados estatisticamente significativos, achou-se importante demonstrar que não houve alteração da expressão de TRIB2 nas condições metabólicas estudadas.

Os resultados estão representados em média \pm desvio padrão e são descritos em cada legenda da figura quando aplicados. De forma a visualizar a variação da expressão nos genes, e para confirmar a análise estatística realizada, procedeu-se à sua representação gráfica utilizando o GraphPad Prism 7.

3.2. Análise da expressão de TRIB2 em tecidos de modelos animais

3.2.1. Animais

Foram utilizados 16 ratinhos *Mus musculus* com 12 semanas de idade: 9 machos (M) e 7 fêmeas (F). Estes ratinhos foram divididos em 2 grupos e cada grupo foi alimentado durante 12 semanas com dietas distintas: dieta rica em gorduras (HFD) e dieta pobre em gorduras (LFD).

As experiências com os modelos animais foram realizadas em colaboração com o Laboratório do Investigador Clévio Nóbrega (CBMR) e foram realizados de acordo com a Diretiva da União Europeia (86/609/CEE) para o cuidado e uso de animais de laboratório. Os investigadores receberam treino adequado e certificação (Federation of Laboratory Animal Science Associations [FELASA] curso certificado) para realizar as experiências das autoridades portuguesas (Direcção Geral de Alimentação e Veterinária).

3.2.2. Tecidos

Foram excisadas amostras tecidulares dos ratinhos mencionados anteriormente. Apesar de se terem recolhido vários tecidos, para o presente trabalho apenas se usaram as amostras de tecido adiposo branco subcutâneo (scWAT). As amostras foram divididas em duas porções: uma para extração de RNA e análise de expressão génica, que se realizou e, outra para análise de proteína, que se pretende realizar no futuro. Desta forma, as amostras foram colocadas em tubos *ependorf* rotulados com o número do ratinho, tipo de tecido (scWAT), o tipo de dieta

(HFD ou LFD) e o tipo de análise que seria feita (R - RNA ou P - proteína). Imediatamente após a respectiva recolha, as amostras foram congeladas e criopreservadas a -80°C até serem processadas e analisadas. No total, havia 32 amostras, sendo que, 16 amostras de scWAT foram utilizadas para análise de RNA e 16 amostras de scWAT para futura análise de proteína.

3.2.3. RNA

3.2.3.1. Extração de RNA

Para a extração de RNA seguiu-se o “*Protocolo para o isolamento do RNA total usando NZYol*” (MB18501). O *NZYol* é um reagente que combina uma mistura de fenol e outros componentes para o isolamento do RNA total, DNA e proteína das células e tecidos. Este reagente provoca a lise das células que expõem os componentes celulares e mantém a integridade do RNA extraído. As amostras biológicas são homogeneizadas em *NZYol* e, seguidamente, separadas nas fases orgânica e aquosa. O RNA permanece na fase aquosa e é, subsequentemente, recuperado por precipitação com álcool isopropílico. O RNA isolado está então adequado para utilizar na Real time PCR (qPCR)⁽⁸⁸⁾.

O protocolo consiste nos seguintes passos:

1. Homogeneização: Usando uma sonda Ultra-Turrax (IKA®), na velocidade 4, homogeneizaram-se 50-100mg de amostra de tecido (scWAT) em 750µL de *NZYol*, de acordo com o protocolo. No fim de homogeneizar todas as amostras, fez-se uma centrifugação a 200xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo rotulado e, as mesmas foram armazenadas a -80°C, até prosseguimento do processo.

2. Separação de fases: Incubaram-se as amostras por 5 minutos a temperatura ambiente. Na *hotte*, adicionaram-se 0,2 mL de clorofórmio por cada mL de *NZYol*, ou seja, 150 µL para cada amostra. Taparam-se os tubos *ependorf* com firmeza e agitaram-se vigorosamente à mão por 15 segundos. Incubaram-se as amostras por 2-3 minutos à temperatura ambiente. Centrifugaram-se as amostras a 12.000xg por 15 minutos a 4°C. A amostra foi separada numa fase verde pálida (fenol-clorofórmio), uma interface esbranquiçada, e uma fase aquosa superior incolor que continha o RNA.

3. Precipitação do RNA: Transferiu-se a fase aquosa (que continha o RNA) para outro tubo *ependorf*, sem perturbar a interface. Precipitou-se o RNA, adicionando 500 µL de isopropanol por 1 mL de *NZYol*, ou seja, 375 µL para cada amostra, misturando de seguida.

Incubaram-se as amostras durante 10 minutos à temperatura ambiente e, seguidamente, os tubos foram colocados a -20°C até prosseguimento do processo.

4. Lavagem do RNA: As amostras anteriores centrifugaram-se a 12.000xg por 10 minutos a 4°C. Eliminou-se o sobrenadante. Lavou-se o sedimento uma vez com 750 µL de etanol a 75%. Agitou-se no *vortex* as amostras e centrifugaram-se a 7500xg por 5 minutos a 4°C, de modo a remover a fase etanólica.

5. Redissolução do RNA: Secou-se o sedimento (descartou-se o sobrenadante e retiraram-se as gotas por capilaridade) até o mesmo ficar transparente. Dissolveu-se em 25-50 µL de água miliQ, dependendo da dimensão aparente de cada sedimento, pipetando cuidadosamente a solução para cima e para baixo, até completa dissolução. Incubou-se por 10 minutos a 55-60°C e fez-se um *spinning* no *vortex*, de modo a recolher todo o volume no fundo do tubo. Por fim, armazenou-se o RNA a -80°C até posterior utilização.

3.2.3.2. Quantificação de RNA

O RNA armazenado anteriormente utilizou-se então para fazer a quantificação de RNA, através da quantificação de ácidos nucleicos, utilizando um espectrofotómetro Nanodrop (2000C, Thermo Scientific).

3.2.3.3. Síntese de cDNA

A síntese de DNA a partir de um modelo de RNA, via transcrição reversa, resulta em DNA complementar (cDNA)⁽⁸⁹⁾.

Para a realização deste protocolo utilizou-se um kit de síntese de cDNA (MB12501). O kit inclui uma combinação de hexómeros aleatórios e de primers oligo (dT)₁₈. Estes *primers* estão incluídos no *NZYRT Master Mix 2x*, que contém também dNTPS, MgCl₂ e um *Buffer* RT otimizado. O *NZYRT Mix* de enzima inclui o *NZY reverse Transcriptase* (RNase H⁻) e *NZY* inibidor da ribonuclease, a fim de proteger o RNA contra a degradação devido à contaminação da ribonuclease. A RNase H (de *E. coli*) é fornecida num tubo separado para degradar especificamente o molde de RNA em híbridos de cDNA:RNA após a síntese de cDNA. Isto faz com que a sensibilidade da reação subsequente de qPCR seja melhor, uma vez que os iniciadores de PCR (*primers*) se ligam mais facilmente ao cDNA. O cDNA resultante é então adequado para usar na qPCR⁽⁹⁰⁾.

Na **Tabela 3.1** estão representados os reagentes e respetivos volumes utilizados.

Tabela 3.1 – Reagentes e respectivos volumes utilizados (adaptado de⁽⁹⁰⁾)

Reagentes	Volume
Master Mix 2x	10 µL
Mix de enzima	2 µL
RNA (2 µg)	x µL
H ₂ O miliQ	qbp 20 µL

Seguiu-se o seguinte protocolo:

1. Como haviam 16 amostras, o volume total de *Master Mix 2x* utilizado foi de 170 µL (n amostras + 1 = 17 amostras x 10 µL = 170 µL) e o volume total de *mix* de enzima utilizado foi 34 µL (17 amostras x 2 µL = 34 µL). Num tubo microcentrífuga estéril e livre de nuclease juntaram-se então as duas *mix*'s e misturaram-se, utilizando o *vortex*.

2. Em gelo, num microtubo de 200 µL estéril e livre de nuclease, adicionou-se então a quantidade calculada (qbp 20 µL) de água miliQ, seguidamente adicionaram-se os 12 µL da mistura preparada no ponto 2. Por fim, adicionou-se o volume correspondente a 2 µg de RNA.

3. Misturou-se delicadamente e, usando um Termociclador TC_48 C1000, incubou-se a 25°C por 10 min, seguidamente a 50°C por 30 min e, por fim, inativou-se a reação aquecendo a 85°C por 5 min.

4. Adicionou-se 1 µL de RNase H (*E. coli*).

5. Incubou-se a 37 °C por 20 min e, finalmente, centrifugou-se e armazenou-se a -20°C até posterior utilização.

3.2.3.4. Primers

Com base em estudos prévios, foram selecionados dois genes de referência (TBP e Ciclofilina (Ppia)) para a obesidade em WAT^(91,92).

Os *primers* estavam no laboratório prontos a utilizar. No entanto, sabe-se que foram desenhados, após seleção dos genes a analisar, utilizando a ferramenta *Primer Blast* da plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e o *Primer Bank* da plataforma *Harvard Medical School* (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>), utilizando os seguintes critérios: a espécie (*Mus musculus*), o tamanho do *amplicon* (100-200 pares de bases), os dois primers *forward* (FW) e *reverse* (RV), terem entre 20 e 25 pares de bases, possuírem temperaturas de fusão (T_m - Temperatura de *melting*) semelhantes entre si e compreendidas

entre 55-63°C, estarem em exões diferentes e o intrão existente entre os exões ter um tamanho >1000 pares de bases. As características dos *primers* selecionados estão na **Tabela 3.2**:

Tabela 3.2 - Características dos primers selecionados

Nome do gene	Símbolo	Número do GenBank	Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho	Tm (°C)
Tribbles 1	TRIB1	NM_144549.4	Fw	GTTCGTCTTCTCCACCGAGG	163	60,1
			Rv	CGCCTTTCAGAGTAGGTCC		
Tribbles 2	TRIB2	NM_144551.5	Fw	TCTGGAGGGAGACCACGTTTT	133	62,8
			Rv	GATGTTGCTATGGGCAGACAG		
Tribbles 3	TRIB3	NM_175093.2	Fw	TTGTCTTGCGCGACCTCAA	106	60,2
			Rv	TCTGATCCAGTCATCACGCAG		
Ciclofilina	Ppia	NM_008907.2	Fw	CCAAACACAAATGGTTCCCAGT	135	60,0
			Rv	ATTCCTGGACCCAAAACGCT		
TATA Binding Protein	TBP	NM_013684.3	Fw	TTGGCTAGGTTTCTGCGGTC	179	60,3
			Rv	TGGAAGGCTGTTGTTCTGGT		

1. Começou-se por diluir o cDNA previamente obtido (ponto 3.2.3.3). Sendo que o volume final seria 200µL e o tubo já continha 1µL de RNase e 20µL de cDNA, adicionaram-se, portanto, 179µL de H₂O.

2. O número total de amostras são: 16 amostras de cDNA e uma amostra de H₂O. Como se fez tudo em duplicado, o total de amostras foram 34. Para ter a certeza, que a quantidade de *mix* (SYBRTM green pcr master mix) preparada fosse suficiente e que chegasse para todas as 34 amostras, mesmo podendo haver alguma perda de *mix* durante a pipetagem, fizeram-se as seguintes contas:

$$33 \text{ amostras} \text{ — } 100\%$$

$$x \text{ — } 8\%$$

$$x = 2,64$$

$$\Rightarrow 33 + 2,64 = 35,64 \text{ amostras} = 36 \text{ amostras.}$$

Assim sendo, a quantidade de *mix* foi preparada em excesso, como se existissem 36 amostras, garantindo que haveria quantidade suficiente para as 34 amostras.

3. Preparou-se uma *Primer mix* para cada gene a analisar na qPCR (5 *eppendorf's* de 1,5 mL, pois são 5 genes de interesse - **Tabela 3.3**).

Tabela 3.3 - Genes de interesse e genes normalizadores

Genes de interesse	Trib1	Trib2	Trib3
Genes normalizadores	TBP	Ciclofilina (Ppia)	

O primer original tinha uma concentração de 100 μM . Preparou-se uma *Primer mix* com um volume final era 50 μL em que cada um dos primers tenha uma concentração de 5 μM . Assim sendo:

Volume final = 50 μL ; Concentração final = 5 μM e Concentração inicial = 100 μM , portanto;

$$\text{Volume inicial} = \frac{50 \times 5}{100} = 2,5 \mu\text{L de primer FW e reverse RV.}$$

Adicionou-se então em cada tubo, 2,5 μL de cada *Primer mix* (FW e RV) e 45 μL de H_2O milliQ (**Tabela 3.4**).

Tabela 3.4 - Reagentes e respectivos volumes utilizados para elaboração do Primer mix

Reagente	Volume (μL)
Primer FW	2,5
Primer RV	2,5
H_2O	45

4. Seguidamente, calculou-se a quantidade de *Primer mix* a utilizar. A Concentração final é 400 nM, então:

Concentração final = 400 nM; Volume final = 10 μL e Concentração inicial = 5 μM , logo,

$$V_i = \frac{400 \times 10}{5} \Leftrightarrow V_i = \frac{0,4 \times 10}{5} = 0,8 \mu\text{L de Primer mix.}$$

5. A *Master mix* é constituída pela enzima, buffer e dNTPs. A **Tabela 3.5** representa os volumes de *Master mix*, *Primer mix* e H_2O , que serão pipetadas para cada poço da placa (volume total de cada poço = 10 μL).

Tabela 3.5 - Reagentes e respectivos volumes utilizados para preencher cada poço da placa qPCR

Reagente	Volume (μL)
Master Mix	5 (porque está 2x concentrada)
Primer Mix	0,8
H ₂ O	1,7

6. Multiplicaram-se os volumes da tabela anterior pelas 34 amostras + 2 amostras extra (total = 36) para se chegar ao volume total a preparar de cada *mix* (Tabela 3.6):

Tabela 3.6 - Reagentes e respectivos volumes totais a preparar de cada *mix*

Reagente	Volume total (μL)
Master Mix	180
Primer Mix	28,8
H ₂ O	61,2

7. Preparou-se uma *Mix* constituída pela *Master Mix*, *Primer Mix* e H₂O (volumes da Tabela 3.6).

3.2.3.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Real time PCR - qPCR)

A PCR é uma técnica de amplificação genética, resultando em altos níveis de sensibilidade e especificidade na bioanálise. Este processo consiste numa reação enzimática usada para amplificar o DNA. Enquanto que a PCR convencional se baseia na análise do ponto final, o qPCR permite monitorizar a amplificação do DNA em tempo real, à medida que a reação prossegue. Isso permite a quantificação precisa dos alvos de DNA.

Seguiu-se o seguinte protocolo de qPCR:

Numa placa qPCR adicionaram-se em cada poço 7,5 μL da *Mix* preparada no passo 7 do protocolo em 3.2.3.4 e 2,5 μL de cDNA do mesmo protocolo (ou água no caso do branco), para perfazer o volume de 10 μL de cada poço. Depois de carregados os pocinhos, “bateu-se” levemente com a placa na mesa para todas as gotas descerem para os pocinhos e tapou-se a placa com adesivo próprio. Colocou-se então a placa numa centrífuga apropriada e centrifugou-se durante 1 minuto a 1000rpm.

A placa com a respetiva localização dos genes é apresentada na **Figura 3.6**, em que T1 corresponde ao TRIB1; T2 ao TRIB2; T3 ao TRIB3; TBP à proteína de ligação TATA (*TATA-box binding protein*); Cy à Ciclofilina. Nos pocinhos da coluna 17 foi adicionada a H₂O. Existem duas linhas para cada gene uma vez que se fizeram duplicados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
A	T1																H ₂ O
B																	
C	T2																
D																	
E	T3																
F																	
G	TBP																
H																	
I	Cy																
J																	

Figura 3.6 - Placa de qPCR com a respetiva localização dos genes (de interesse e normalizadores)

Por fim, usou-se o Termociclador (Bio-Rad, CFX384), para executar o seguinte protocolo:

1. 10' a 95°C (1 ciclo)
 2. 15'' a 95°C
 3. 60'' a 60°C
- **Total de 51 ciclos (50 + 1)**

Melting curve:

1. 5'' a 65°C
2. 0,5'' a 95°C
3. 4°C (∞)

Depois de concluído o protocolo anterior, é fornecida uma tabela no computador com a letra e respetivo número dos poços da placa (por exemplo, A01) e o número de ciclos obtidos em determinado limiar (*threshold*). Esta informação foi organizada no Excel com o nome da amostra, respetiva localização na placa e número de ciclos obtido para posterior quantificação da expressão de mRNA.

3.2.3.6. Quantificação da expressão relativa de mRNA

A quantificação da expressão relativa de mRNA é utilizada para analisar alterações na expressão génica numa determinada amostra relativamente a uma amostra de referência. Para proceder à quantificação relativa é necessária a amplificação de genes *housekeeping*, isto é, genes com expressão estável em diferentes situações testadas. Desta forma, procede-se à comparação dos ciclos obtidos na qPCR (Ct's) das amostras com os Ct's de um controlo, normalizados pelos Ct's obtidos com a amplificação dos genes de referência. Assim sendo, neste caso, procede-se à comparação dos Ct's das amostras HFD (dieta rica em gorduras) com os Ct's do grupo controlo LFD (dieta pobre em gorduras), normalizados pelos Ct's dos genes TBP e Ppia.

De forma a saber qual o melhor gene *housekeeping*, ou seja, o melhor gene de manutenção, fez-se uma normalização entre ambos genes normalizadores (TBP e Ppia) e cada um dos genes de interesse (TRIB1, TRIB2, TRIB3). Para tal, fizeram-se alguns cálculos. Primeiro calculou-se a diferença entre a média de Ct's dos genes de interesse e a média de Ct's dos genes normalizadores, através da seguinte fórmula:

$$\Delta Ct_{amostra} = Ct_{interesse} - Ct_{normalizador}$$

Seguidamente, calculou-se a diferença entre os ΔCt 's de cada amostra e a média dos ΔCt 's do grupo controlo (LFD), através da fórmula seguinte:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra} - \bar{x}Ct_{controlo}$$

Por fim, calculou-se a expressão relativa pela fórmula:

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

4. Resultados

4.1. Avaliação dos níveis de expressão de TRIB2 em tecidos metabólicos usando os Perfis GEO

Usaram-se os Perfis GEO para avaliar os níveis de expressão de TRIB2, avaliando a sua regulação fisiológica em diferentes tecidos sensíveis à insulina (fígado, músculo esquelético e tecidos adiposos branco e castanho) em resposta a condições específicas (obesidade, DM2, resistência à insulina) e diferentes estímulos (exposição ao frio, dieta, tratamentos

farmacológicos, etc.), em humanos e modelos murinos. Pretendeu-se aprofundar o entendimento sobre o potencial metabólico e a expressão de TRIB2 nestes tecidos específicos.

Assim sendo, fez-se a pesquisa conforme descrita na metodologia.

4.1.1. Fígado

Para a análise da expressão de TRIB2 no fígado obtiveram-se valores estatisticamente significativos para o GDS3876, pertencente ao organismo *Homo sapiens* do género feminino, em que se fez a comparação entre mulheres magras (não diabéticas) vs. mulheres obesas (incluindo diabéticas e não diabéticas). Obteve-se uma diminuição de 30% da expressão de TRIB2 no fígado do grupo obeso (que inclui diabéticos e não diabéticos) ($n=5-9$, $p=0,006$) (**Figura 4.1 (A)**).

Para o GDS3850, pertencente ao organismo *Rattus norvegicus*, em que se fez a comparação entre animais magros (fa/+) vs. animais obesos (fa/fa), obteve-se uma diminuição de 40% da expressão de TRIB2 nos ratos Zucker obesos (não diabéticos) ($n=3$, $p=0,066$) (**Figura 4.1 (B)**).

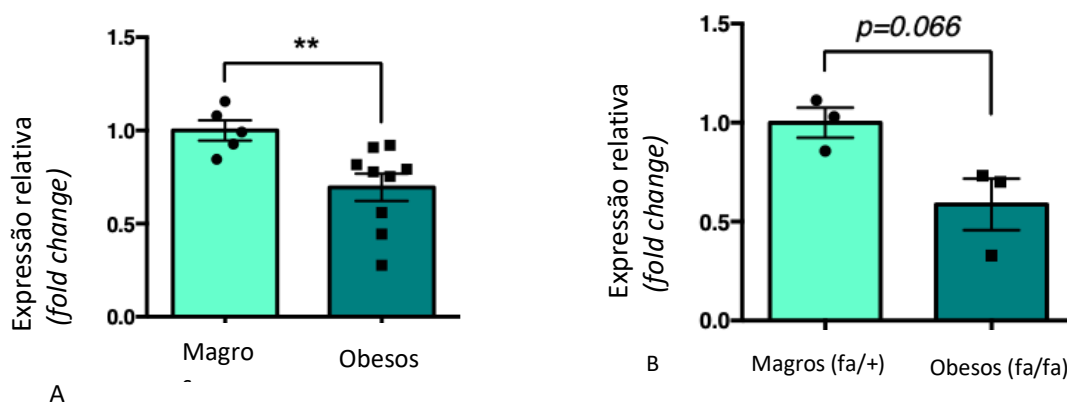


Figura 4.1 - Expressão de TRIB2 no fígado

(A) – Diminuição de 30% da expressão de TRIB2 no fígado de mulheres obesas (diabéticas e não diabéticas) ($n=5-9$, $p<0,01$). (B) – Diminuição de 40% da expressão de TRIB2 em ratos Zucker obesos (não diabéticos) ($n=3$, $p=0,066$).

4.1.2. Músculo esquelético

Após análise de dados do músculo esquelético obtiveram-se vários GDS em que nenhum deles demonstrou um resultado estatisticamente significativo, o que significa que não houve alteração da expressão de TRIB2 no músculo esquelético nas diferentes condições selecionadas. Ainda assim, analisaram-se alguns GDS pertencentes ao organismo *Homo sapiens*: o GDS268,

no qual se compararam indivíduos não obesos *vs.* indivíduos obesos (**Figura 4.2 (A)**); o GDS3681, comparando miotubos isolados de indivíduos controle *vs.* indivíduos com DM2 (**Figura 4.2 (B)**); o GDS3104, no qual se compararam biópsias do músculo de indivíduos controle *vs.* indivíduos com resistência à insulina associada ao síndrome do ovário poliquístico (PCOS) (**Figura 4.2 (C)**); e, por fim, o GDS4897, comparando biópsias do músculo esquelético de indivíduos saudáveis controle *vs.* indivíduos com resistência à insulina hereditária (genética) (**Figura 4.2 (D)**).

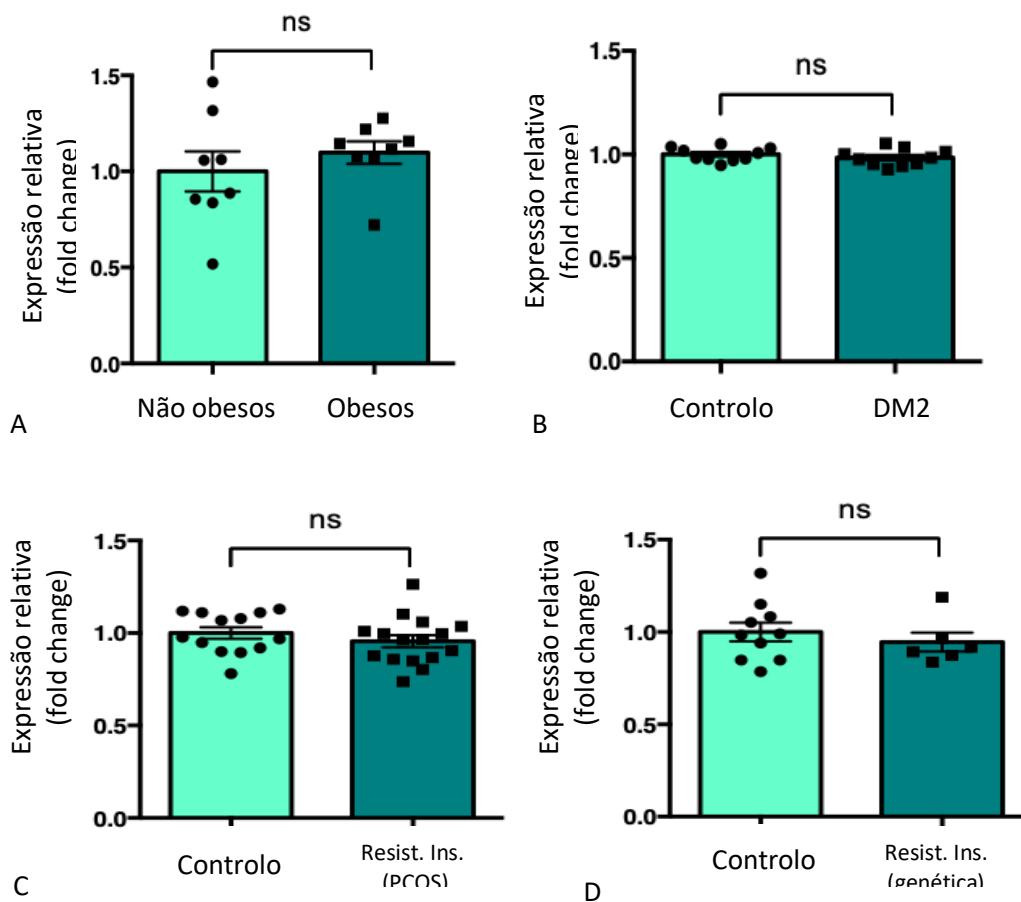


Figura 4.2 - Expressão de TRIB2 no músculo esquelético

Em humanos, a expressão de TRIB2 no músculo esquelético não revelou diferenças significativas ($p > 0,05$) em diferentes condições, tais como (A) obesidade, (B) DM2 (miotubos), (C) resistência à insulina associada à síndrome do ovário poliquístico (PCOS) e (D) resistência à insulina hereditária (genética).

4.1.3. Comparação da expressão de TRIB2 no BAT e WAT de modelos de ratos e ratinhos

Para esta análise foram selecionados o GDS3135, pertencente ao organismo *Rattus norvegicus* (**Figura 4.3 (A)**), e o GDS2813 que pertence ao organismo *Mus musculus* (**Figura**

4.3 (B)), nos quais se compara a expressão de TRIB2 no BAT e no WAT. Verificou-se um aumento de 100% (Figura 4.3 (A)) e um aumento de 30% (Figura 4.3 (B)), da expressão de TRIB2 no WAT em relação ao BAT. Na Figura 4.3 (C) compara-se a expressão de Ucp1 no BAT e WAT, sendo que a Ucp1 é utilizada como controlo positivo para a expressão do BAT, pois expressa-se preferencialmente neste tecido.

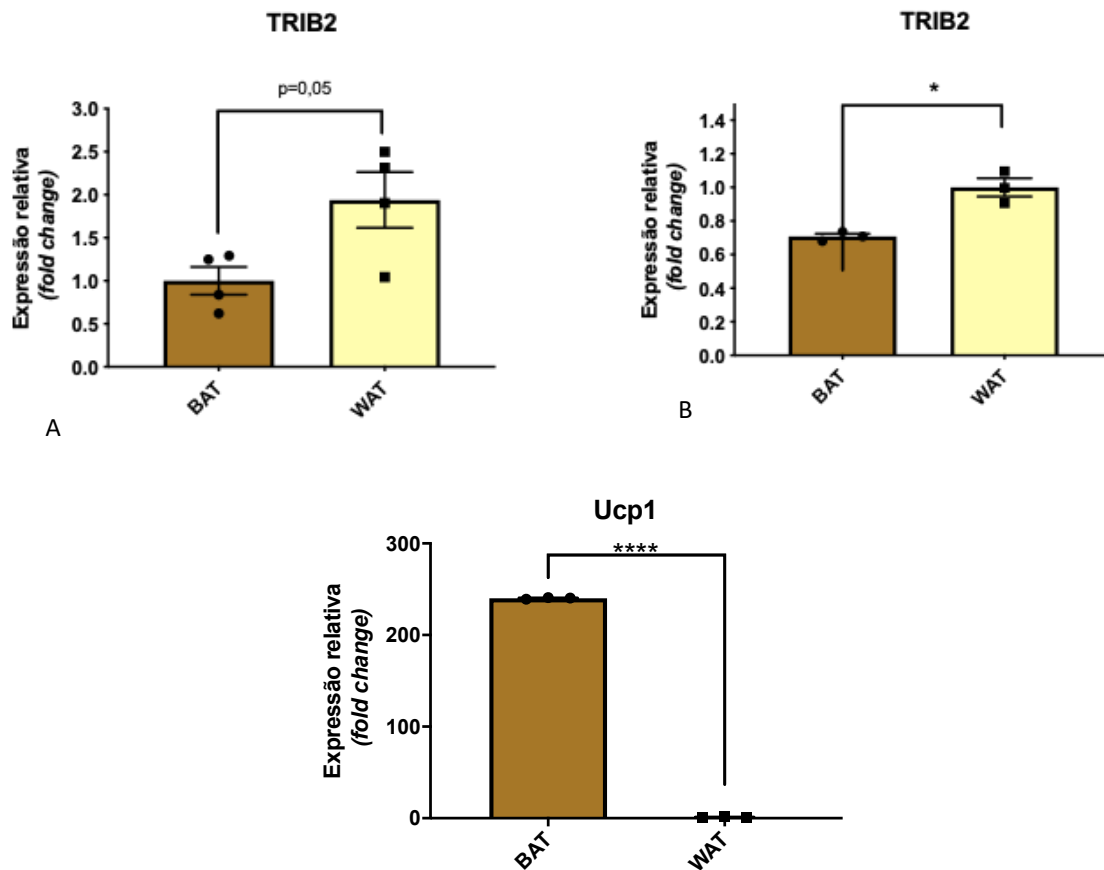


Figura 4.3 - Níveis de TRIB2 e Ucp1 no BAT e no WAT

(A) aumento de 100% dos níveis de TRIB2 no WAT em ratos (GDS3135_1385124_at) (n=4 cada grupo); (B) aumento de 30% da expressão de TRIB2 no WAT em ratinhos (GDS2813_1426640_s_at) ($p<0,05$) e (C) expressão preferencial de Ucp1 no BAT (GDS2813_1418197_at) ($p<0,0001$) em ratinhos (n=3 cada grupo). Ucp1 foi usado como controlo positivo para a expressão do BAT.

4.1.4. Tecido adiposo branco (WAT)

Através da análise dos dados de tecido adiposo branco, obtiveram-se dois resultados com significado estatístico: o GDS3688 que pertence ao organismo *Homo sapiens* e no qual se fez a comparação do tecido adiposo visceral de crianças controlo vs. obesas, obtendo-se um aumento de 40% da expressão de TRIB2 no grupo obeso (n=5-6, $p=0,0023$) (Figura 4.4 (A)). Além disso, obteve-se o GDS3602, pertencente ao organismo *Homo sapiens*, no qual se

compararam os adipócitos abdominais subcutâneos maduros cultivados derivados de indivíduos magros vs. indivíduos obesos, ambos do sexo masculino e feminino, sendo que se obteve um aumento de 34% da expressão de TRIB2 nos indivíduos obesos ($n=10$, $p=0,0290$) (Figura 4.4 (B)).

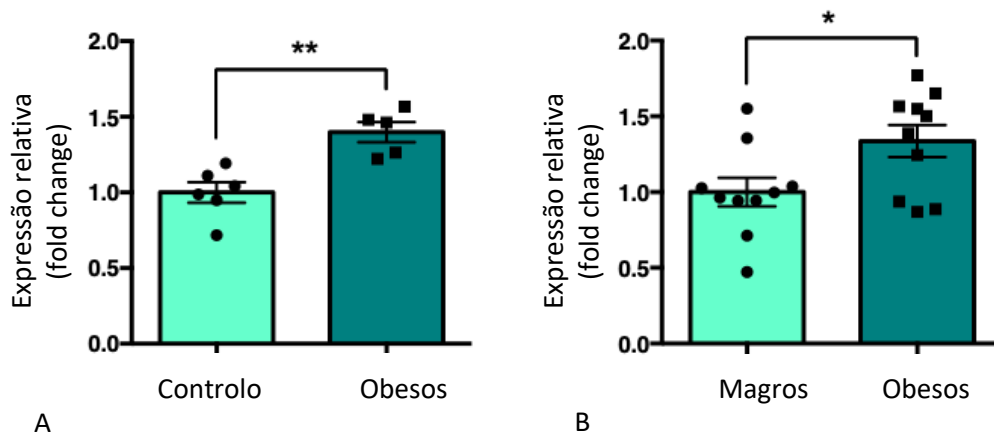


Figura 4.4 - Expressão de TRIB2 no WAT

(A) - Aumento de 40% da expressão de TRIB2 no tecido adiposo visceral de crianças obesas ($n=5-6$, $p<0,01$). (B) - Aumento de 34% da expressão de TRIB2 em adipócitos abdominais subcutâneos maduros cultivados derivados de pacientes obesos ($n=10$, $p<0,05$).

4.1.4.1. Expressão de TRIB2 e Ucp1 em pré-adipócitos primários do tecido adiposo branco inguinal (scWAT) de ratinhos tratados com rosiglitazona

Para esta pesquisa incluíram-se tratamentos, neste caso, com rosiglitazona, uma vez que, esta substância aumenta a sensibilidade à insulina e, parece exercer o seu efeito terapêutico através do tecido adiposo, explorando-se então a expressão de TRIB2 e Ucp1 no scWAT.

Ao tratar os adipócitos primários do scWAT com rosiglitazona o fenótipo do scWAT fica semelhante ao do BAT, esperando-se então um aumento da expressão de Ucp1,⁽³³⁾ como se confirma na **Figura 4.3 (C)**.

Através da análise do GDS4021 pertencente ao organismo *Mus musculus*, no qual se compara a expressão de TRIB2 ((**Figura 4.5 (A)**) e Ucp1 (**Figura 4.5 (B)**) entre pré-adipócitos primários do scWAT não tratados vs. tratados com rosiglitazona, verificou-se uma diminuição

de 40% da expressão de TRIB2 nos adipócitos primários tratados com rosiglitazona e um aumento de 100x da expressão de Ucp1 nos adipócitos primários tratados com rosiglitazona.

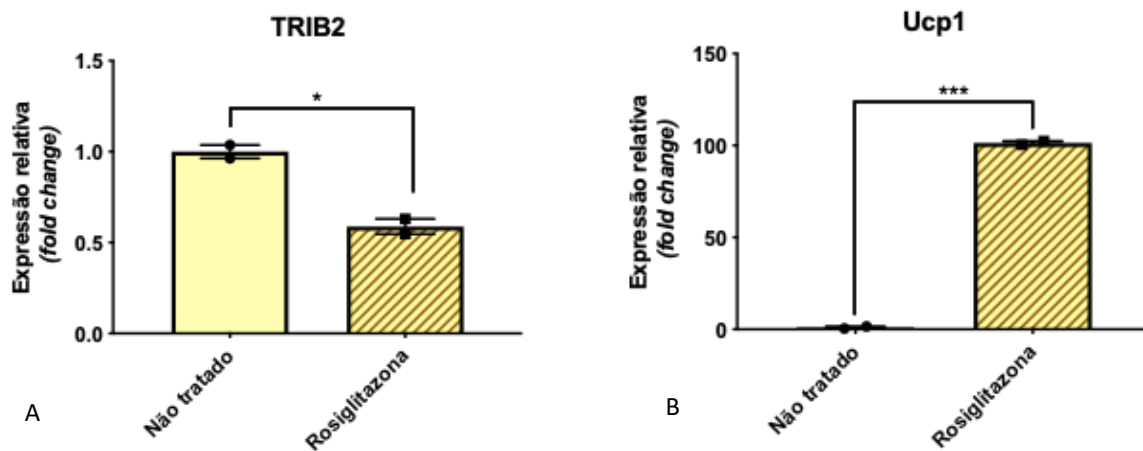


Figura 4.5 - Expressão de TRIB2 e Ucp1 em pré-adipócitos primários do scWAT tratados e não tratados com rosiglitazona.

Verifica-se uma diminuição de 40% da expressão de (A) TRIB2 (GDS4021_1426640_s_at) ($p=0,02$) e (B) aumento de 100x da Ucp1 (GDS4021_1418197_at) ($p=0,0006$) em pré-adipócitos primários do scWAT de ratinhos não tratados e tratados com rosiglitazona ($n=2$ cada grupo).

4.1.5. Tecido adiposo castanho (BAT)

4.1.5.1. Expressão de TRIB2 no BAT de ratinhos após exposição ao frio

Nesta pesquisa foi selecionado o GDS4850 pertencente ao organismo *Mus musculus*, no qual se comparou a expressão de TRIB2 no BAT de ratinhos à temperatura ambiente vs. exposição ao frio (4°C) (Figura 4.6). Verificou-se um aumento de 50% nos níveis de TRIB2, tendencialmente estatisticamente significativo, quando os animais estiveram expostos ao frio.

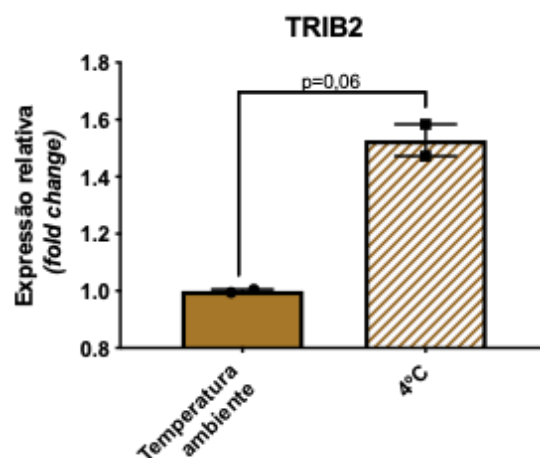


Figura 4.6 - Níveis de TRIB2 no BAT após exposição ao frio

Verifica-se um aumento de 50% dos níveis de TRIB2 no BAT de ratinhos após exposição ao frio (GDS4850_2432552) ($n=2$ cada grupo).

4.2. Análise da expressão génica

4.2.1. Quantificação da expressão relativa de mRNA

Neste procedimento através de qPCR, avaliou-se quantitativamente a expressão génica de TRIB2 no scWAT de *Mus musculus* alimentados com LFD e HFD, com o propósito de obter 2 grupos distintos: magro/normal controlo e obeso, respetivamente. O objetivo foi validar quantitativamente o que se observou na análise dos GDS do tecido adiposo (aumento de TRIB2 em indivíduos obesos).

Nas **Figuras 4.7, 4.8 e 4.9** compara-se a expressão de TRIB1, TRIB2 e TRIB3 no scWAT entre o grupo LFD e HFD, normalizados com o gene Ciclofilina (**A**) e TBP (**B**).

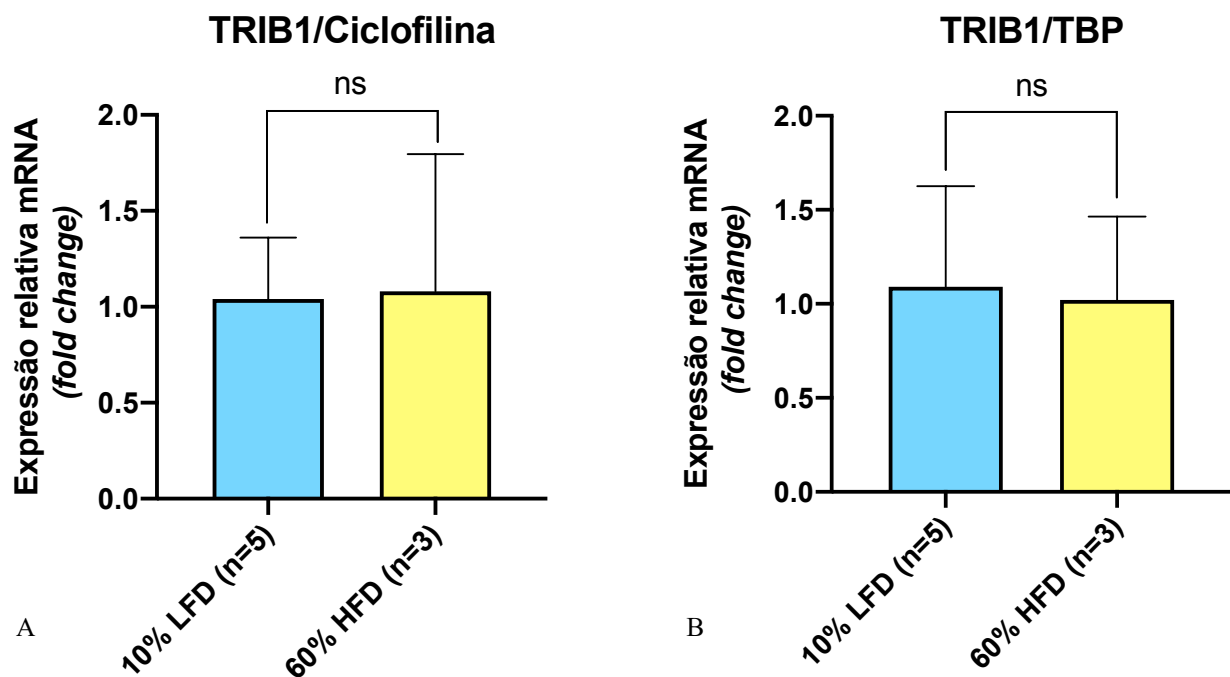


Figura 4.7 - Expressão de TRIB1 entre grupo LFD vs. HFD normalizado com o gene de referência Ciclofilina (A) e TBP (B)

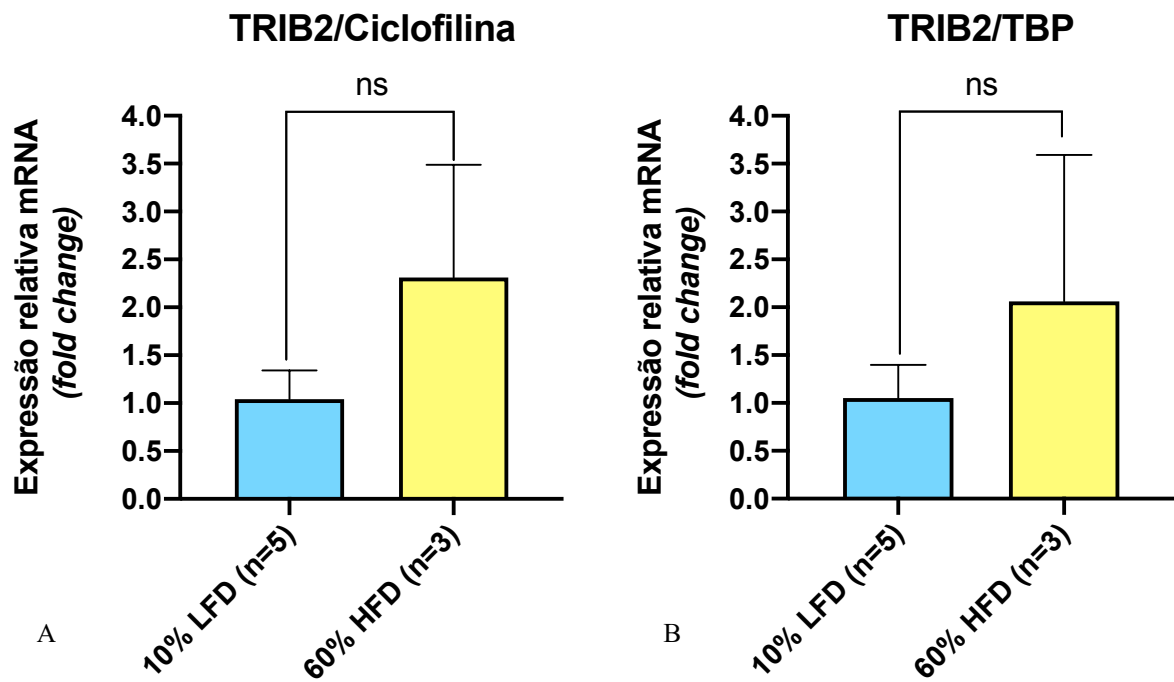


Figura 4.8 - Expressão de TRIB2 entre grupo LFD vs. HFD normalizado com o gene de referência Ciclofilina (A) e TBP (B)

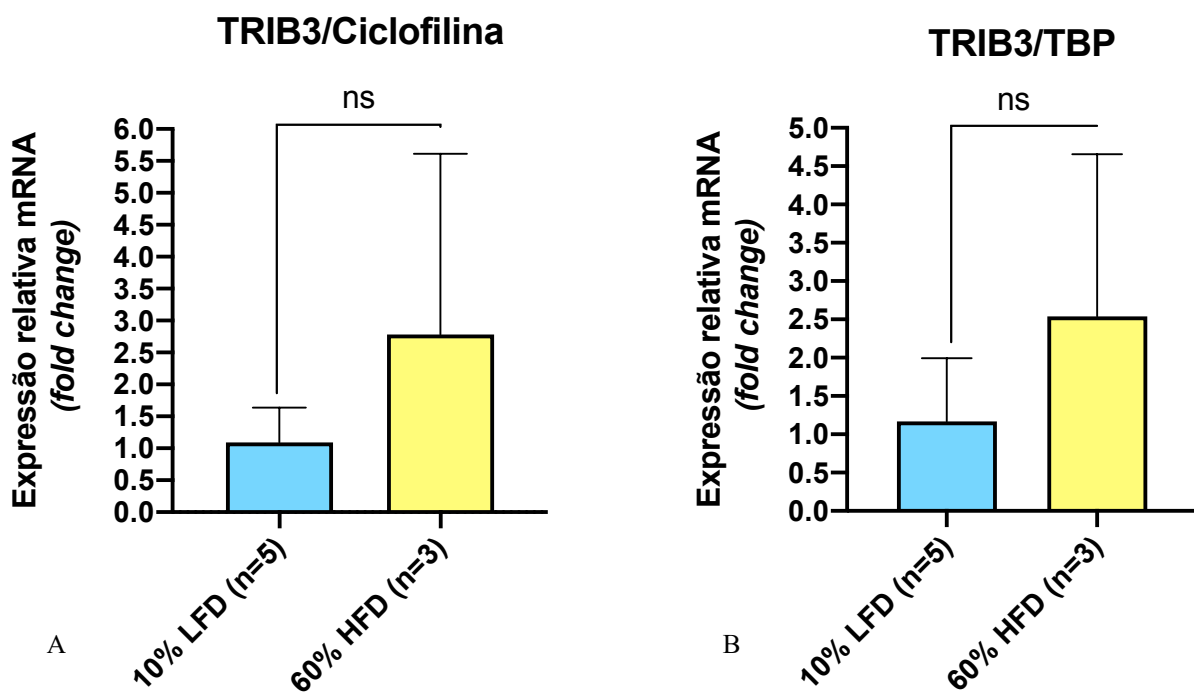


Figura 4.9 - Expressão de TRIB3 entre grupo LFD vs. HFD normalizado com o gene de referência Ciclofilina (A) e TBP (B)

Através da análise das **Figuras 4.7 a 4.9** pode constatar-se que a expressão dos três TRIB's entre o grupo LFD e HFD (e normalizados com ambos os genes de referência), não têm uma alteração estatisticamente significativa.

5. Discussão

Um dos objetivos deste trabalho consistiu na avaliação dos níveis de expressão de TRIB2 nos tecidos metabólicos selecionados, em resposta a condições específicas, usando os perfis *GEO*.

Através de pesquisa bibliográfica, verificou-se que existem relativamente poucos estudos (cerca de 19) sobre TRIB2 relacionado com as doenças metabólicas.

O fígado gordo é frequente em grandes consumidores de álcool, na DM e na obesidade⁽⁹³⁾. A obesidade reflete um estado pró-inflamatório generalizado com alto risco para comorbilidades metabólicas. As evidências sugerem que o tecido adiposo visceral está diretamente associado ao desenvolvimento e progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD)⁽⁹⁴⁾. A lesão hepatocelular que caracteriza esta doença é impulsionada por uma sobrecarga de substratos metabólicos primários (glicose, frutose e ácidos gordos) no fígado, resultando no desvio de ácidos gordos para vias que promovem a lesão celular e uma resposta disfuncional a essa lesão⁽⁹⁵⁾. Os mecanismos patológicos mais importantes nesta doença envolvem um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e adipocinas por parte do tecido adiposo visceral e libertação de ácidos gordos livres na circulação sistémica, causando dislipidémia e resistência à insulina sistémica. Pacientes obesos com NAFLD geralmente não apresentam sintomas específicos, além de IMC elevado, manifestações de síndrome metabólica e níveis normais ou moderadamente elevados de enzimas hepáticas⁽⁹⁴⁾.

Através da análise dos resultados observa-se que nas amostras de fígado humano houve uma diminuição de 30% da expressão de TRIB2 na obesidade ($p=0,006$) e em amostras de ratos Zucker com fígado gordo houve uma diminuição de 40% na expressão de TRIB2 ($p=0,06$). Através de pesquisa bibliográfica percebeu-se que nada se sabe sobre a expressão de TRIB2 no fígado em doenças metabólicas. Existem sim vários estudos^(5,59,96) sobre TRIB2 em diversos tipos de cancro (incluindo o de fígado⁽⁹⁷⁾) mas, de facto, ainda há muito para estudar sobre este gene e a sua regulação, nas doenças metabólicas. Relativamente ao TRIB1, estudos anteriores demonstraram que o aumento da expressão hepática específica de TRIB1 levou a uma redução TG e o colesterol circulantes, reduzindo a produção de lipoproteínas VLDL, enquanto que os ratinhos *knockout* para TRIB1 têm TG e colesterol elevados⁽⁶⁾. Em humanos, TRIB1 está

associado ao aumento do conteúdo de gordura no fígado e doenças cardiovasculares⁽⁹⁸⁾. Nos resultados da expressão de TRIB2 no fígado e, sendo que nos obesos a expressão diminuiu, poderá pensar-se que possa haver também uma relação entre a diminuição do TRIB2 e o aumento dos TG e do colesterol, tal como acontece com TRIB1, uma vez que existe uma forte associação positiva entre a obesidade e os TG e colesterol, pois o excesso de peso é uma das causas que mais provoca o aumento dos TG⁽⁹⁹⁾.

O aumento da massa adiposa que ocorre na obesidade é determinada pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia). Os pré adipócitos são induzidos para se diferenciarem em adipócitos imaturos sob controlo do PPAR γ , o qual também induz a expressão de C/EBP α . Estes dois genes atuam então em conjunto para regular a conversão de adipócitos imaturos em maduros⁽¹⁰⁰⁾. Na obesidade a capacidade de armazenamento do WAT é limitada e, a sobrecarga calórica adicional leva ao acumular de gordura nos tecidos ectópicos (por exemplo, fígado, músculo esquelético e coração) e nos depósitos adiposos viscerais (designado como lipotoxicidade). A nutrição excessiva desencadeia respostas inflamatórias descontroladas no WAT, levando à inflamação crónica de baixo grau e, portanto, promovendo a progressão da resistência à insulina⁽¹⁰¹⁾.

Em contraste com a expressão hepática, a análise do WAT de pacientes adultos obesos mostrou que a expressão de TRIB2 aumentou 34% ($p=0,029$). Consistentemente, uma coorte de crianças obesas revelou um aumento de 40% dos níveis de TRIB2 no WAT ($p=0,002$). Também nos níveis de expressão de TRIB2 no BAT comparado com o WAT, verificou-se que TRIB2 é preferencialmente expresso no WAT (aumento de 100x nos ratos e 30% nos ratinhos). A proteína Ucp1 foi usada como controlo positivo, uma vez que se expressa quase exclusivamente no BAT e na indução de adipócitos beges, e em níveis muito baixos em tecido adiposo branco⁽¹⁰²⁾. Vários autores defendem a hipótese que a obesidade está associada à redução da função ou atividade do tecido adiposo castanho⁽¹⁰³⁾. Sabe-se que TRIB2 exibe um efeito anti-adipogénico, ou seja, com o aumento da sua expressão também se aumenta a degradação de C/EBP β ⁽⁸⁰⁾. C/EBP β é um fator chave de transcrição na diferenciação de adipócitos castanhos⁽¹⁰⁴⁾. Poderá então pensar-se que ao aumentar a degradação de C/EBP β há uma diminuição na diferenciação de adipócitos castanhos. Nos resultados, TRIB2 aumenta na obesidade (onde hipoteticamente há uma redução da função do BAT⁽¹⁰³⁾) e está também aumentado no WAT indo ao encontro da hipótese sugerida.

O motivo de se querer estudar a expressão de TRIB2 no músculo esquelético é devido ao fato deste tecido ser também um tecido metabólico de excelência, pois é neste tecido que a insulina promove a utilização e armazenamento de glicose⁽¹⁰⁵⁾. No músculo esquelético, nos

estudos em humanos, não se encontraram diferenças significativas na expressão de TRIB2 em condições como a obesidade, DM2, resistência à insulina associada a PCOS ou genética. Tal como aconteceu com a pesquisa de artigos sobre o TRIB2 referente ao fígado, também no músculo esquelético a pesquisa de artigos foi dificultada por apenas existirem 5 resultados a falar sobre a sua expressão no músculo. Em relação a TRIB1, descreve-se um papel potencial do mesmo no músculo esquelético, em que este gene teve uma expressão significativamente menor no grupo magro ativo em comparação com o grupo magro/obeso sedentário e diminuiu com o exercício físico. Desta forma, TRIB1 pode ser visto como um regulador potencial dos efeitos do treino aeróbio no músculo esquelético humano⁽¹⁰⁶⁾. Já TRIB3 mostrou estar aumentado no músculo esquelético em DM2 e pode prejudicar a sinalização da insulina⁽¹⁰⁷⁾. A inibição de TRIB3 melhora a sensibilidade à insulina in vivo principalmente de uma maneira dependente de PPAR- γ ⁽¹⁰⁸⁾. O treino físico também induziu um aumento robusto na expressão de TRIB3 e a capacidade de exercícios de animais transgênicos melhorou⁽¹⁰⁹⁾. Serão necessários mais estudos para perceber qual o papel de TRIB2 no músculo esquelético e se terá alguma semelhança com a expressão dos outros dois TRIBs.

Ao observar os resultados anteriores, sugere-se que TRIB2 poderá ter um papel ligado à acumulação de gordura e inflamação, de forma tecido-específica, ou seja, especificamente no WAT e no WAT de obesos, pois há um aumento da sua expressão nessas condições.

Observou-se que os níveis de TRIB2 aumentaram cerca de 50% em resposta ao frio no BAT. Surge então a hipótese desta proteína também estar de alguma forma envolvida na termogênese. Segundo um artigo⁽¹¹⁰⁾, a expressão de Ucp1 é baixa em WAT e aumenta no BAT e no tecido adiposo bege (onde há transformação de adipócitos brancos em adipócitos castanhos) estimulado. Também a termogênese adaptativa e a vascularização é mais baixa no WAT e mais elevada no tecido adiposo bege estimulado e no BAT. Durante a exposição ao frio, o fluxo sanguíneo através do tecido vascularizado é aumentado, dispersando assim o calor⁽¹¹¹⁾. Além disso, sabe-se que o WAT em resposta ao frio desenvolve características do BAT, gastando energia na forma de calor⁽¹¹²⁾. Nos resultados, se a Ucp1 se expressa no BAT e está relacionado à termogênese e, no BAT a expressão de TRIB2 é mais elevada na exposição ao frio, então poderá haver a hipótese de o TRIB2 também aumentar no WAT, após exposição ao frio, devido ao seu acastanhamento, para dissipar calor para manter a temperatura corporal estável. Constata-se que, apesar de já haver alguma informação nestas condições, os resultados são contraditórios, (ou seja, no WAT há um aumento de TRIB2, o que leva a pensar que há uma diminuição da diferenciação de adipócitos castanhos e no BAT há também um aumento de TRIB2 após a exposição ao frio) sendo necessários mais estudos. Seria então interessante,

fazer um novo estudo em que o WAT seria submetido à exposição de frio a 4°C, para ver se a expressão de TRIB2 também aumentaria nessa condição.

Relativamente à expressão de TRIB2 e Ucp1 em pré-adipócitos primários do tecido adiposo branco inguinal (scWAT) de ratinho, há uma diminuição de 40% de TRIB2 nas células tratadas com rosiglitazona e um aumento de 100x da expressão de Ucp1. Segundo o estudo de onde se retirou o GDS4021 para fazer a análise de TRIB2⁽³³⁾ ao tratar os adipócitos primários do scWAT com rosiglitazona, um agonista do Ppar γ , o fenótipo do scWAT fica semelhante ao do BAT, verificando-se um aumento da expressão de Ucp1, aumentando a capacidade da termogênese específica do BAT⁽³³⁾. Também outro estudo⁽¹¹³⁾ refere que agentes como tiazolidinedionas (TZD), agonistas do Ppar γ , podem recrutar depósitos existentes de BAT e promover o acastanhamento de WAT. Assim, tal como esperado, observou-se o aumento da expressão Ucp1 com rosiglitazona. O tratamento com rosiglitazona aumenta ligeiramente a adipogênese⁽³³⁾. Como TRIB2 tem um efeito inibitório na adipogênese e durante a diferenciação TRIB2 diminui a sua expressão⁽⁸⁰⁾, poderá ser devido a esses dois aspetos que se verifique uma diminuição de TRIB2. Além disso, verificou-se um aumento de TRIB2 no WAT. Se, ao tratarem-se os adipócitos com rosiglitazona, ocorre uma modificação do fenótipo do WAT para ficar semelhante ao BAT, então faria sentido a expressão de TRIB2 diminuir uma vez que no BAT se verificou a sua expressão reduzida.

O segundo objetivo deste trabalho consistiu em avaliar quantitativamente a expressão génica de TRIB2 no tecido adiposo branco subcutâneo (scWAT) de modelos animais *Mus musculus* alimentados com LFD e HFD, através da realização de PCR quantitativa, de forma a validar quantitativamente o que se observou na análise dos GDS do tecido adiposo (ou seja, um aumento de TRIB2 em indivíduos obesos). Além da expressão de TRIB2 também se avaliou a expressão de TRIB1 e TRIB3 para entender se a variação da expressão entre o grupo LFD e HFD é semelhante nos três genes ou se TRIB2 se expressa de forma diferente dos outros dois genes.

Verificou-se uma redução do número da amostra (n), sendo que o n inicial do grupo LFD era 9 e o n inicial do grupo HFD era 7. No entanto, reduziu-se o grupo LFD para n=5 e HFD para n=3, pois em algumas amostras não se obteve valores de Ct's (porque não houve amplificação do DNA) e, além disso, através dos cálculos efetuados, excluíram-se algumas amostras em que o desvio padrão era demasiado elevado.

Através dos resultados obtidos pode constatar-se que a expressão dos três TRIBs entre o grupo LFD e HFD (e normalizados com dois genes de referência independentes), não têm uma

alteração estatisticamente significativa. Não foi então possível cumprir o objetivo de validar a informação obtida na análise dos GDS do tecido adiposo.

6. Conclusões e perspectivas futuras

Através da análise dos dados GEO pode concluir-se que

- ✓ No fígado ocorre uma diminuição da expressão de TRIB2 na obesidade;
- ✓ O TRIB2 poderá ter um papel importante na acumulação de gordura e inflamação, pois no WAT ocorre um aumento da expressão de TRIB2 na obesidade e há uma expressão preferencial no WAT, quando comparado com o BAT;
- ✓ No músculo esquelético não se encontraram diferenças significativas na expressão de TRIB2 em diferentes condições (obesidade, DM2, resistência à insulina associada à PCOS e resistência à insulina hereditária);
- ✓ Os níveis de TRIB2 no BAT aumentaram em resposta ao frio, levando a pensar que este gene possa estar de alguma forma associado à termogénese;
- ✓ O TRIB2 poderá ser um alvo da rosiglitazona (um agonista do PPAR γ), podendo (direta ou indiretamente) regular negativamente a sua expressão, pois os níveis de TRIB2 no WAT diminuíram com a rosiglitazona.

A análise dos dados de qPCR

- ✓ possibilitou a quantificação relativa dos genes (TRIB1, TRIB2 e TRIB3) entre animais com uma dieta pobre em gorduras (LFD) e rica em gorduras (HFD). No entanto, em nenhum dos TRIBs se observou uma alteração estatisticamente significativa, não sendo possível validar quantitativamente o que se observou na análise dos GDS do tecido adiposo.

Como existem relativamente poucos estudos sobre TRIB2 relacionado com doenças metabólicas, futuramente ambiciona-se aprofundar o conhecimento neste tema, através da quantificação proteica de TRIB2 nos tecidos metabólicos (tecido adiposo, músculo esquelético e fígado). Assim, pretende-se entender de que forma a modulação de TRIB2 poderá ser uma ferramenta utilizada no combate às doenças metabólicas, através do seu potencial reconhecimento como um alvo farmacológico em distúrbios metabólicos.

7. Referências Bibliográficas

1. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev.* 2007;87(2):507–20.
2. Biro FM, Wien M. Childhood obesity and adult morbidities. *Am J Clin Nutr.* 2010;91:1499–505.
3. Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E. Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal.* 2007;19(2):238–50.
4. Hill R, Madureira PA, Ferreira B, Baptista I, Machado S, Colaço L, et al. TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT. *Nat Commun.* 2017;8:1–9.
5. Link W. Tribbles breaking bad: TRIB2 suppresses FOXO and acts as an oncogenic protein in melanoma. *Biochem Soc Trans.* 2015;43:1085–8.
6. Cunard R. Mammalian Tribbles Homologs at the Crossroads of Endoplasmic Reticulum Stress and Mammalian Target of Rapamycin Pathways. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:1–17.
7. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(4):183–9.
8. Seeley, R.R.; Stephens, T.D. ; Tate P. *Anatomia & Fisiologia.* 2008.
9. Quintas, Alexandre; Freire, Ana Ponces; Halpern MJ. *Bioquímica Organização Molecular da Vida.* 2008.
10. McKee. Carbohydrate metabolism [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from: https://global.oup.com/us/companion.websites/fdscontent/uscompanion/us/static/companion.websites/9780199730841/McKee_Chapter8_Sample.pdf
11. Paredes-Flores, Manuel A.; Shamim SM. Biochemistry, Glycogenolysis [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554417/>
12. Casem. Chapter 11 - Cell Metabolism. *Case Stud Cell Biol* [Internet]. 2016;263–81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128013946000117>
13. Malheiros SVP. Integração Metabólica Nos Períodos Pós-Prandial E De Jejum – Um Resumo. *Rev Ensino Bioquímica.* 2006;4(1):16.
14. Borges JC. Aula de Bioquímica Avançada [Internet]. [cited 2020 Apr 3]. Available from: <https://docplayer.com.br/39855204-Aula-de-bioquimica-avancada-gliconeogenese-glicogenio-glicogenolise-sintese-e-regulacao.html>
15. Blanco, Antonio; Blanco G. *Carbohydrate Metabolism.* 2017.
16. Huang C, Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2015;16(1):924–49.
17. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2011;1811(11):637–47.
18. Fontes R. Lipoproteínas plasmáticas [Internet]. [cited 2020 Apr 18]. Available from: https://users.med.up.pt/~ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2010-2011/G2010-2011/2G04_Lipoproteinas_plasmaticas.pdf
19. Lipolysis and the Oxidation of Fatty Acids [Internet]. [cited 2020 Apr 20]. Available from: <https://themedicalbiochemistrypage.org/lipolysis-and-the-oxidation-of-fatty->

acids/#mito-oxidation

20. Borges JC. Metabolismo dos lípidos [Internet]. [cited 2020 Apr 21]. Available from: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4111134/mod_resource/content/1/Aula08Bioq II_Metabolismo de Lipídeos.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4111134/mod_resource/content/1/Aula08BioqII_Metabolismo%20de%20Lip%C3%ADdeos.pdf)
21. Caleb, B.; Shamim SM. Biochemistry, Ketone Metabolism [Internet]. [cited 2020 Apr 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554523/>
22. Programa Nacional de Combate à Obesidade [Internet]. 2005 [cited 2020 Mar 21]. Available from: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-03dgcg-de-17032005-pdf.aspx>
23. McKenney RL, Short DK. Tipping the balance: The pathophysiology of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Surg Clin North Am* [Internet]. 2011;91(6):1139–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2011.08.007>
24. IMC [Internet]. [cited 2020 Mar 21]. Available from: <http://www.ipr.pt/index.aspx?p=IMC>
25. Vijay A, Valdes AM. The metabolomic signatures of weight change. *Metabolites*. 2019;9(4).
26. Mais de metade da população com 18 ou mais anos tinha excesso de peso [Internet]. 2015 [cited 2020 Mar 9]. Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=224733757&DESTAQUESmodo=2
27. Fundação Portuguesa de Cardiologia: Obesidade [Internet]. [cited 2020 Mar 9]. Available from: <http://www.fpcardiologia.pt/saude-do-coracao/factores-de-risco/obesidade/>
28. Panorama da Obesidade em Portugal [Internet]. [cited 2020 Mar 9]. Available from: [https://www.academianacionalmedicina.pt/Backoffice/UserFiles/File/Documentos/Obesidade PORTUGAL.pdf](https://www.academianacionalmedicina.pt/Backoffice/UserFiles/File/Documentos/Obesidade%20PORTUGAL.pdf)
29. Murawska-Cialowicz E. Adipose tissue - morphological and biochemical characteristic of different depots [Internet]. 2017. [cited 2020 Sep 15]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28665277/>
30. Saltiel AR, Olefsky JM. An old perspective on a new problem. *J Clin Invest* [Internet]. 2017;7(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5199684/pdf/jci-127-88883.pdf>
31. Fonseca-Alaniz M, Takada J, Alonso-Vale MIC, Bessa Lima F. Tecido Adiposo e Regulação Metabólica. *Arq Bras Endocrinol e Metab*. 2006;50(2):216–29.
32. Heeren J, Scheja L. Brown adipose tissue and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2018;29(3):180–5.
33. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR γ agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*. 2012;15(3):395–404.
34. Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013;154(9):2992–3000.
35. Plaisier CL, Bennett BJ, He A, Guan B, Lusis AJ, Reue K, et al. Zbtb16 has a role in brown adipocyte bioenergetics. *Nutr Diabetes*. 2012;2(SEPTEMBER).
36. Van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL,

- Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500–8.
37. WHO. Global Report on Diabetes. Isbn [Internet]. 2016;978:6–86. Available from: http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.htmlhttp://www.who.int/about/licensing/copyright_form/index.html<https://apps.who.int/iris/handle/10665/204871><http://www.who.int/about/licensing/>
 38. ABC da Diabetes [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://apdp.pt/diabetes/abc-da-diabetes/>
 39. International Diabetes Federation [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes.html>
 40. Correia LG, Boavida JM, Cardoso M, Duarte JS, Duarte R, Nunes JS, et al. Diabetes: Factos e Números 2009-Relatório Anual do Observatório nacional da Diabetes. Portugal. *Soc Port Diabetol*. 2009;32.
 41. Roden M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation und Diagnose. *Wien Klin Wochenschr*. 2016;128:37–40.
 42. Rustenbeck I. Diabetes mellitus. *Med Monatsschr Pharm* [Internet]. 2019;42(9):323–5. Available from: https://www.oedg.at/pdf/OEDG_Pocket_Guide_2019-07.pdf
 43. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2015;38(January):S8–16. Available from: https://care.diabetesjournals.org/content/38/Supplement_1/S8.full-text.pdf
 44. Diabetes Gestacional [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://www.freestylediabetes.pt/a-diabetes/sobre-a-diabetes/diabetes-gestacional>
 45. Complicações da Diabetes [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://apdp.pt/diabetes/complicacoes/>
 46. Em 2013 perderam-se 4 683 anos potenciais de vida devido à diabetes mellitus - 2013 [Internet]. 2014 [cited 2020 Mar 16]. Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaquas&DESTAQUESdest_boui=222369740&DESTAQUESmodo=2
 47. Instituto Nacional de Estatística [Internet]. [cited 2020 Apr 17]. Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008206&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt
 48. Simple Steps to Preventing Diabetes [Internet]. [cited 2020 Sep 24]. Available from: https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/disease-prevention/diabetes-prevention/preventing-diabetes-full-story/#Simple_steps
 49. Controlar a Diabetes [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://controlardiabetes.pt/entender-a-diabetes/complicacoes-associadas-a-diabetes-mellitus>
 50. The Pancreas [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/the-pancreas>
 51. Longnecker D. Anatomy and histology of the pancreas. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl Base* [Internet]. 2014;1–26. Available from: <https://www.pancreapedia.org/reviews/anatomy-and-histology-of-pancreas>https://www.pancreapedia.org/sites/default/files/V2_Mounted_9-27_updated.pdf<http://arxiv.org/abs/1706.06319>

52. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(4):2133–223.
53. Wilcox G. Insulin and Insulin Resistance. *Clin Biochem.* 2005;26:19–39.
54. Tokarz VL, MacDonald PE, Klip A. The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol.* 2018;217(7):1–17.
55. Navale AM, Paranjape AN. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev.* 2016;8(1):5–9.
56. Haber EP, Curi R, Carvalho CR, Carpinelli AR. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2001;45(3):219–27.
57. Rorsman P, Eliasson L, Renström E, Gromada J, Barg S, Göpel S. The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol Sci.* 2000;15(2):72–7.
58. Link W, Fernandez-Marcos PJ. FOXO transcription factors at the interface of metabolism and cancer. *Int J Cancer.* 2017;141(12):2379–91.
59. Zanella F, Renner O, García B, Callejas S, Dopazo A, Peregrina S, et al. Human TRIB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells. *Oncogene.* 2010;29(20):2973–82.
60. Unterman TG. Regulation of Hepatic Glucose Metabolism by FoxO Proteins, an Integrated Approach. 1st ed. Vol. 127, *Current Topics in Developmental Biology.* Elsevier Inc.; 2018. 119–147 p.
61. Roy SK, Srivastava RK, Shankar S. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J Mol Signal.* 2010;5:1–13.
62. Diabetes [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://www.health.harvard.edu/topics/diabetes>
63. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39(3):481–97.
64. Vojislav C, Natasa R, Milica P, Slobodan A, Radivoj K, Danijela R, et al. Incidence trend of type 1 diabetes mellitus in Serbia. *BMC Endocr Disord.* 2020;20(1).
65. Diabetes mellitus a to z [Internet]. [cited 2020 Mar 17]. Available from: https://www.health.harvard.edu/a_to_z/type-1-diabetes-mellitus-a-to-z
66. Cetoacidose Diabética [Internet]. [cited 2020 Mar 10]. Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-endócrinos-e-metabólicos/diabetes-melito-e-distúrbios-do-metabolismo-de-carboidratos/cetoacidose-diabética-cad>
67. Type2 Diabetes mellitus [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/117853-overview>
68. Diabetes mellitus [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-endócrinos-e-metabólicos/diabetes-melito-e-distúrbios-do-metabolismo-de-carboidratos/diabetes-melito-dm>
69. Duarte L. Curso Gestores da Prevenção da Diabetes Tipo 2. *Diabetes Care.* 2010;
70. Diabetes Symptoms [Internet]. [cited 2020 Mar 16]. Available from: <https://www.diabetes.org/diabetes/type-2/symptoms>

71. Ma J, Matkar S, He X, Hua X. FOXO family in regulating cancer and metabolism. *Semin Cancer Biol.* 2018;50(May):32–41.
72. Lee, Sojin; Dong HH. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *J Endocrinol.* 2017;233(2):R67–R79.
73. Yadav RK, Chauhan AS, Zhuang L, Gan B. FoxO transcription factors in cancer metabolism. *Semin Cancer Biol.* 2018;50(December 2017):65–76.
74. Richmond L, Keeshan K. Pseudokinases: a tribble-edged sword. *FEBS J.* 2019;1–13.
75. Yokoyama T, Nakamura T. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci.* 2011;102(6):1115–22.
76. Dobens LL, Bouyain S. Developmental roles of tribbles protein family members. *Dev Dyn.* 2012;241(8):1239–48.
77. Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, et al. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 2004;279(41):42703–8.
78. Burkhardt R, Toh SA, Lagor WR, Birkeland A, Levin M, Li X, et al. Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4410–4.
79. Keeshan K, He Y, Wouters BJ, Shestova O, Xu L, Sai H, et al. Tribbles homolog 2 inactivates C/EBP α and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2006;10(5):401–11.
80. Naiki T, Saijou E, Miyaoka Y, Sekine K, Miyajima A. TRB2, a mouse tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting AKT and C/EBP. *J Biol Chem.* 2007;282(33):24075–82.
81. Eder K, Guan H, Sung HY, Ward J, Angyal A, Janas M, et al. Tribbles-2 is a novel regulator of inflammatory activation of monocytes. *Int Immunol.* 2008;20(12):1543–50.
82. Hill R, Kalathur RKR, Colaço L, Brandão R, Ugurel S, Futschik M, et al. Trib2 as a biomarker for diagnosis and progression of melanoma. *Carcinogenesis.* 2014;36(4):469–77.
83. Zareen N, Biswas SC, Greene LA. A feed-forward loop involving Trib3, Akt and FoxO mediates death of NGF-deprived neurons. *Cell Death Differ.* 2013;20(12):1719–30.
84. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015;1(4):505–27.
85. Karim MA, Craig RL, Wang X, Hale TC, Elbein SC. Analysis of FOXO1A as a candidate gene for type 2 diabetes. *Mol Genet Metab.* 2006;88(2):171–7.
86. About GEO profiles [Internet]. [cited 2020 Feb 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/profiles.html>
87. GEO Profiles [Internet]. [cited 2020 Feb 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/>
88. Protocol for the isolation of Total RNA using NZYol [Internet]. [cited 2020 Mar 15]. Available from: https://www.nzytech.com/wp-content/uploads/2019/04/mb185_pb_v1901.pdf
89. 5 Steps to Optimal cDNA Synthesis [Internet]. [cited 2020 Apr 15]. Available from: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/pcr/reverse-transcription/5steps-cDNA.html>

90. Protocol for first-strand cDNA synthesis. Available from: <https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/rnacdna/cdna-synthesis/cdna-kits/mb125/>
91. Gong H, Sun L, Chen B, Han Y, Pang J, Wu W, et al. Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. *Sci Rep.* 2016;6(September):1–12.
92. Cabiati M, Raucci S, Caselli C, Guzzardi MA, D'Amico A, Prescimone T, et al. Tissue-specific selection of stable reference genes for real-time PCR normalization in an obese rat model. *J Mol Endocrinol.* 2012;48(3):251–60.
93. Gonçalves, Karine; Fernandes MM. *Atlas de Fisiologia Humana.* Girassol; 2009.
94. Milić S, Lulić D, Štimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9330–7.
95. Neuschwander-Tetri BA. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med.* 2017;15(1):1–6.
96. Grandinetti KB, Stevens TA, Ha S, Salamone RJ, Walker JR, Zhang J, et al. Overexpression of TRIB2 in human lung cancers contributes to tumorigenesis through downregulation of C/EBP α . *Oncogene.* 2011;30(30):3328–35.
97. Wang J, Park JS, Wei Y, Rajurkar M, Cotton JL, Fan Q, et al. TRIB2 acts downstream of Wnt/TCF in liver cancer cells to regulate YAP and C/EBP α function. *Mol Cell.* 2013;51(2):211–25.
98. Bauer RC, Yenilmez BO, Rader DJ. Tribbles-1: A novel regulator of hepatic lipid metabolism in humans. *Biochem Soc Trans.* 2015;43:1079–84.
99. Illán Gómez F, González Ortega M, Aragón Alonso A, Orea Soler S, Alcaraz Tafalla M. S, Pérez Paredes M, et al. Obesity, endothelial function and inflammation: the effects of weight loss after bariatric surgery. *Nutr Hosp.* 2016;33(6):1340–6.
100. César Farias de Queiroz J, Isabel Cardoso Alonso-Vale M, Curi R, Bessa Lima F. Controle da adipogênese por ácidos graxos Control of adipogenesis by fatty acids. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009;53(5):582–94.
101. Longo M, Zatterale F, Naderi J, Parrillo L, Formisano P, Raciti GA, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).
102. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(1):53–6.
103. Timmons, James A.; Pederson BK. The Importance of Brown Adipose Tissue. *N Engl J Med.* 2009;361(4):1–3.
104. Nakayama K, Iwamoto S. An adaptive variant of TRIB2, rs1057001, is associated with higher expression levels of thermogenic genes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *J Physiol Anthropol.* 2017;36(1):1–5.
105. Lima-Silva AE, Fernandes TC, De-Oliveira FR, Nakamura FY, Gevaerd MDS. Muscle glycogen metabolism during exercise: Mechanism of regulation. *Rev Nutr.* 2007;20(4):417–29.
106. Vega RB, Brouwers B, Parsons SA, Stephens NA, Pino MF, Hodges A, et al. An improvement in skeletal muscle mitochondrial capacity with short-term aerobic training is associated with changes in Tribbles 1 expression. *Physiol Rep.* 2020;8(12):1–13.

107. Liu J, Wu X, Franklin JL, Messina JL, Hill HS, Moellering DR, et al. Mammalian Tribbles homolog 3 impairs insulin action in skeletal muscle: Role in glucose-induced insulin resistance. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2010;298(3):565–76.
108. Weismann D, Erion DM, Ignatova-Todorava I, Nagai Y, Stark R, Hsiao JJ, et al. Knockdown of the gene encoding *Drosophila* tribbles homologue 3 (Trib3) improves insulin sensitivity through peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) activation in a rat model of insulin resistance. *Diabetologia.* 2011;54(4):935–44.
109. An D, Lessard SJ, Toyoda T, Lee MY, Koh HJ, Qi L, et al. Overexpression of TRB3 in muscle alters muscle fiber type and improves exercise capacity in mice. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2014;306(12):925–33.
110. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;19(1):25–37.
111. RYLANDER E, PŘIBYLOVÁ H, LIND J. a Thermographic Study of Infants Exposed To Cold. *Acta Pædiatrica.* 1972;61(1):42–8.
112. Finlin BS, Dupont-versteegden EE, Philip A, Finlin BS, Memetimin H, Confides AL, et al. Human adipose beiging in response to cold and mirabegron Find the latest version : Human adipose beiging in response to cold and mirabegron. *JCI Insight.* 2018;3(15).
113. Fukui Y, Masui SI, Osada S, Umesono K, Motojima K. A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR- γ activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAy obese mice. *Diabetes.* 2000;49(5):759–67.

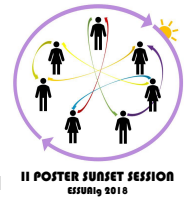
ANEXOS

ANEXO 1 – Poster: *TRI(B)pping Over Metabolism*: Exploring the Role of TRIB2 in Metabolic Tissues

TRI(B)pping Over Metabolism: Exploring the Role of TRIB2 in Metabolic Tissues

Rodrigues-Viegas V¹, Machado S^{2,3}, Ferreira B^{1,2,3,4}, Link W^{2,3,4}, De Sousa-Coelho AL^{2,3,5,6}

¹Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Department of Chemistry and Pharmacy, Faculty of Sciences and Technology; ²CBMR, Centre for Biomedical Research; ³ABC, Algarve Biomedical Center; ⁴DCBM, Department of Biomedical Sciences and Medicine; ⁵ESSUAIG, School of Health; ⁶CESUAIG, Centro de Estudos e Desenvolvimento em Saúde.
1,2,3,4,5,6 University of Algarve, Faro, Portugal.



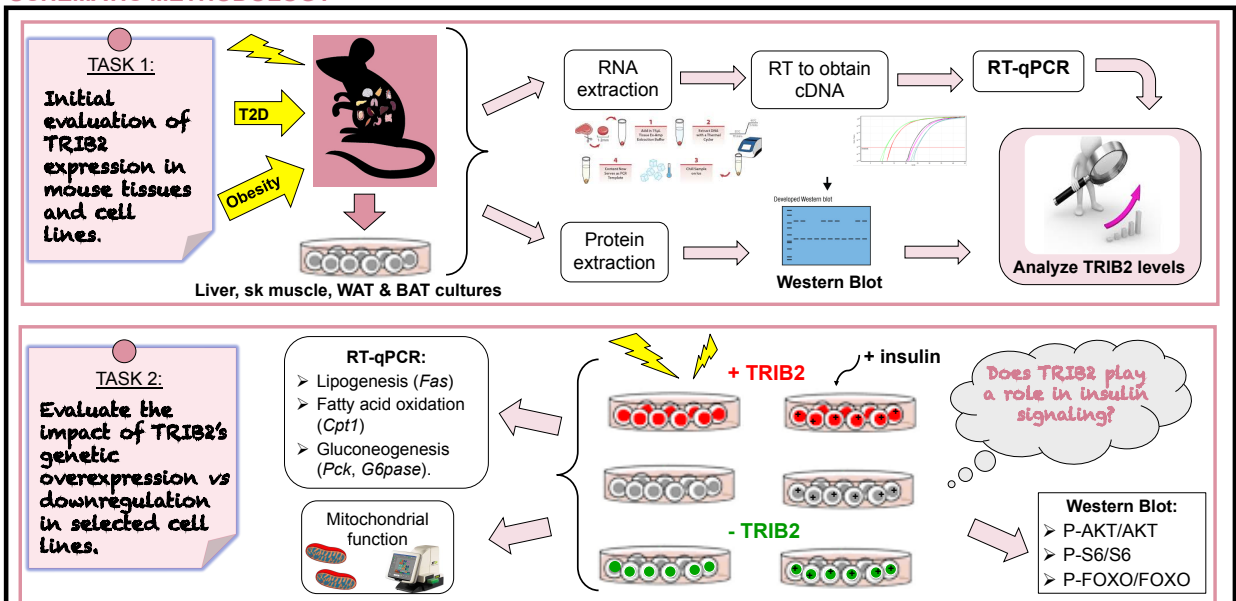
INTRODUCTION

The incidence of type 2 diabetes (T2D) and insulin resistance is increasing at an alarming rate which is greatly associated to the epidemic of obesity.^{1,2} Therefore, identifying novel molecular mechanisms related to metabolic diseases is very important. TRIB2 is one of three members of the Tribbles family of pseudokinases proteins³. Instead of direct phosphorylation of target proteins, tribbles act as adaptors in signaling pathways for important cellular processes.⁴ Our laboratory discovered that TRIB2 interacts and activates protein kinase AKT, associated to the suppression of FOXO and FOXO-dependent target genes.^{5,6} FOXO proteins mediate insulin action on key functions involved in cell metabolism, growth and aging. Since changes in the insulin signaling are associated with altered metabolic functions, we hypothesize that **TRIB2 might play an essential role in insulin sensitivity and cellular metabolism**.

OBJECTIVES

- ✓ Assessing the physiological regulation of TRIB2 in insulin-sensitive tissues and under specific conditions: nutrient excess or deprivation, metabolic diseases (T2D, obesity, etc.) and stress conditions (exercise, etc.).
- ✓ Unraveling TRIB2's role in metabolism by modulating TRIB2's expression levels and analyzing its phenotype in detail.

SCHEMATIC METHODOLOGY



EXPECTED RESULTS

The results obtained might be critical to help defining the mechanisms related to diabetes and other metabolic diseases. We hope to **identify a targetable mechanism** to alleviate the impairments in the insulin signaling pathway observed in obese, insulin resistance and diabetic patients, potentially leading to the **future development of new and more effective treatments**.

REFERENCES

- 1 – World Health Organization. Global Report on Diabetes. *Isbn*. 2016:978:88.
- 2 – Seidell JC. Obesity, insulin resistance and diabetes – a worldwide epidemic. *Br J Nutr*. 2000;83 Suppl 1(2000):S5-S8
- 3 – Hegedus Z, Ozibula A, Kiss-Toth E. Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal*. 2007; 19(2):238-250.
- 4 – Yokoyama T, Nakamura T. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci*. June 2011, vol.102.6, 1115-1122.
- 5 – Hill R, Madureira PA, Ferreira B, et al. TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT. *Nat Commun*. 2017;8:14687.
- 6 – Link W. Tribbles breaking bad: TRIB2 suppresses FOXO and acts as an oncogenic protein melanoma. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(5):1085-1088.

ACKNOWLEDGEMENTS

SM was supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia (ProRegeM: PD/BD/114258/2016).



ANEXO 2 – Poster: Análise da expressão de *TRIB2* em tecidos sensíveis à insulina associados à obesidade.

Análise da expressão de *TRIB2* em tecidos sensíveis à insulina associados à obesidade.

Rodrigues-Viegas V.¹, Link W.^{2,3,4}, De Sousa-Coelho A.L.^{2,3,5,6}

¹Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Department of Chemistry and Pharmacy, Faculty of Sciences and Technology; ²CBMR, Centre for Biomedical Research; ³ABC, Algarve Biomedical Center; ⁴DCBM, Department of Biomedical Sciences and Medicine; ⁵ESSUAIG, School of Health; ⁶CESUAIG, Centro de Estudos e Desenvolvimento em Saúde. ^{1,2,3,4,5,6}University of Algarve, Faro, Portugal.

INTRODUÇÃO

A incidência da Diabetes tipo 2 (DM2) e resistência à insulina tem vindo a aumentar num ritmo alarmante, ambos associados à obesidade.^{1,2} Desta forma, identificar novos mecanismos moleculares relacionados com as doenças metabólicas é muito importante.

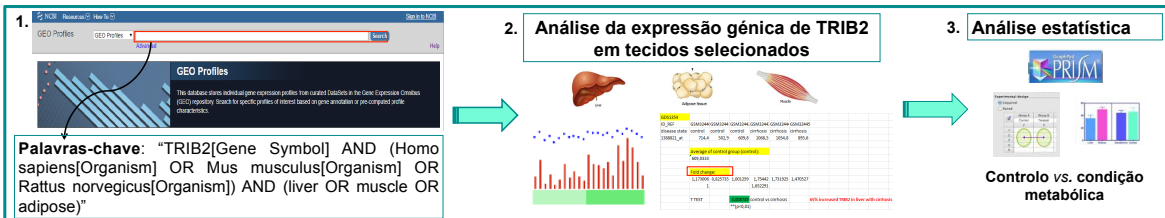
TRIB2 é um dos três membros da família das pseudoquinases *Tribbles*³ e foi identificado como sendo um supressor das proteínas FOXO^{4,5} que medeiam a ação da insulina nas principais funções envolvidas no metabolismo, crescimento e envelhecimento celular.

Como as alterações na sinalização da insulina estão associadas a funções metabólicas alteradas, supomos que *TRIB2* pode desempenhar um papel essencial na sensibilidade à insulina e no metabolismo celular.

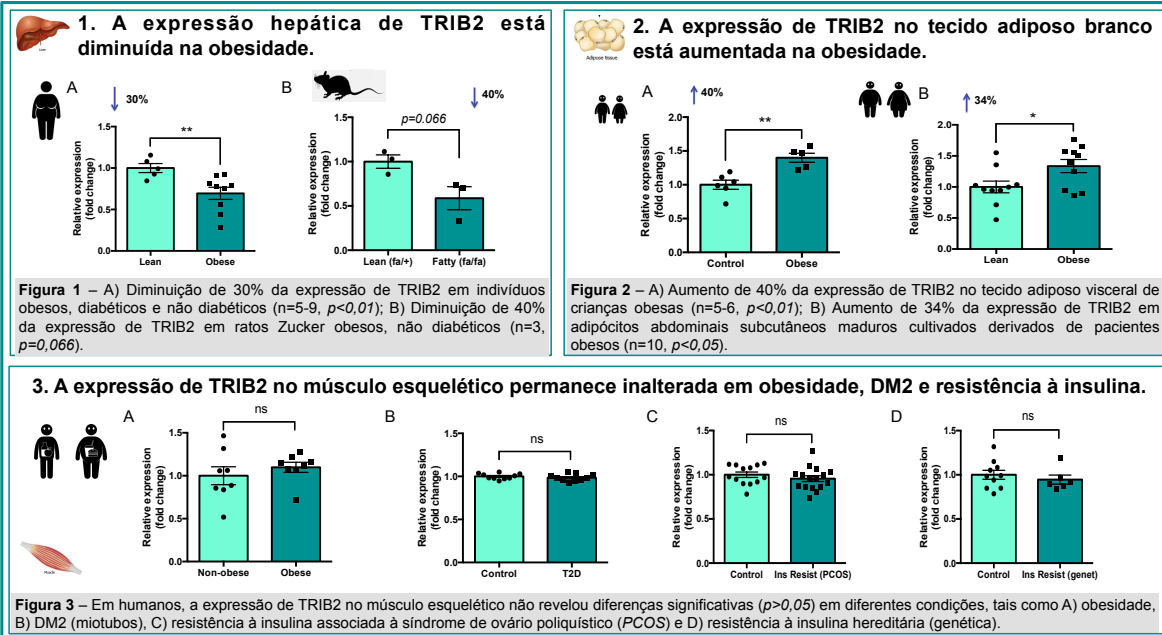
OBJETIVO

Aprofundar o conhecimento sobre o potencial metabólico e a expressão de *TRIB2* em tecidos como o fígado, músculo esquelético e tecido adiposo branco, em obesidade e insulino-resistência.

METODOLOGIA



RESULTADOS



CONCLUSÃO

Encontrou-se uma expressão diferencial de *TRIB2* na obesidade, no fígado e no tecido adiposo, embora em direções opostas. Verificou-se uma diminuição de *TRIB2* hepático, enquanto que *TRIB2* se encontrava aumentado no tecido adiposo branco, em obesos. No entanto, não se encontraram diferenças na expressão de *TRIB2* no músculo esquelético. Assim sendo, *TRIB2* pode ter um papel importante na acumulação de gordura e na inflamação, de forma tecido-específica. Entender a função de *TRIB2* nessas circunstâncias parece ser fundamental para o potencial reconhecimento de *TRIB2* como um alvo farmacológico em distúrbios metabólicos.

REFERÊNCIAS

- World Health Organization. Global Report on Diabetes. *Isbn.* 2016;978:88.
- Seidell JC. Obesity, insulin resistance and diabetes – a worldwide epidemic. *Br J Nutr.* 2000;83 Suppl 1(2000):S5-S8.
- Hegedus Z, Czubala A, Kiss-Toth E. Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal.* 2007; 19(2):238-250.
- Hill R, Madureira PA, Ferreira B, et al. *TRIB2* confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT. *Nat Commun.* 2017;8:14687.
- Link W. Tribbles breaking bad: *TRIB2* suppresses FOXO and acts as an oncogenic protein melanoma. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(5):1085-1088.



TRIB2 Gene Expression Regulation in Brown Adipose Tissue

Rodrigues-Viegas V.¹, Link W.^{2,3,4}, De Sousa-Coelho A.L.^{2,3,5,6}

¹Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Department of Chemistry and Pharmacy, Faculty of Sciences and Technology; ²CBMR, Centre for Biomedical Research; ³ABC, Algarve Biomedical Center; ⁴DCBM, Department of Biomedical Sciences and Medicine; ⁵CESUALg, Centro de Estudos e Desenvolvimento em Saúde; ⁶CENIE (Centro Internacional sobre o Envelhecimento) - ^{1,2,3,4,5,6}University of Algarve, Faro, Portugal.

1. INTRODUCTION

Better understanding adipose tissue transcriptional profile is of great interest due the worldwide epidemic of obesity and its associated metabolic disorders, such as insulin resistance and diabetes. While white fat cells primary function is energy storage in the form of triglycerides, brown fat cells oxidize fuels and dissipate energy in the form of heat, which makes them an attractive target for obesity therapy.

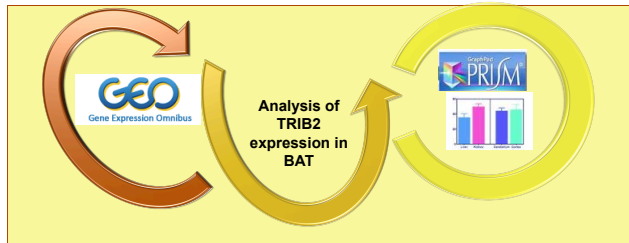
The transcription factor PPAR γ is the master regulator of adipocyte differentiation¹, and its expression is controlled by pro-adipogenic factors such as C/EBPs, as well as anti-adipogenic factors like FOXO proteins.

TRIB2 is one of three members of the Tribbles family², which interacts and activates the protein kinase AKT, associated to the suppression of FOXO and FOXO-dependent target genes^{3,4}. TRIB2 overexpression increases C/EBP β degradation in cultured white preadipocytes, leading to a suppression of adipocyte differentiation⁵. While TRIB2 was found to be downregulated during adipogenesis⁵, we have recently identified TRIB2 to be increased in the white adipose tissue (WAT) of obese individuals⁶.

2. OBJECTIVES

- ✓ To evaluate *TRIB2* expression in brown adipose tissue (BAT) in response to different stimuli;
- ✓ To identify factors that regulate *TRIB2* expression;
- ✓ To uncover *TRIB2* potential role in BAT thermogenesis as a target for obesity treatment.

3. METHODOLOGY



4. RESULTS

1. *Trib2* gene is less expressed in BAT in rat and mouse models, when compared to WAT.

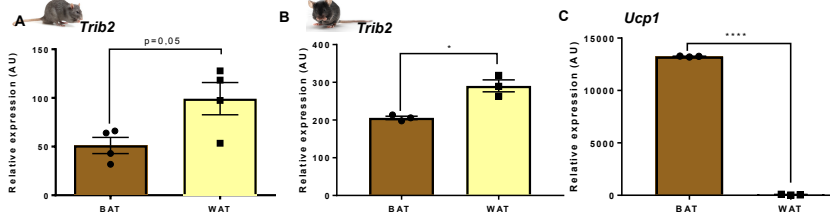


Figure 1 – *Trib2* levels in BAT and WAT in rat (n=4 each group) (A), *Trib2* ($p=0.03$) (B) and *Ucp1* ($p<0.0001$) (C) levels in BAT and WAT in mouse (n=3 each group). *Ucp1* was used as positive control for BAT expression.

2. *Trib2* expression is increased in BAT after cold exposure.

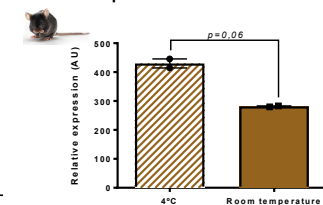


Figure 2 – *Trib2* levels in BAT in mouse (n=2 each group).

3. *Trib2* expression is decreased upon rosiglitazone in inguinal scWAT.

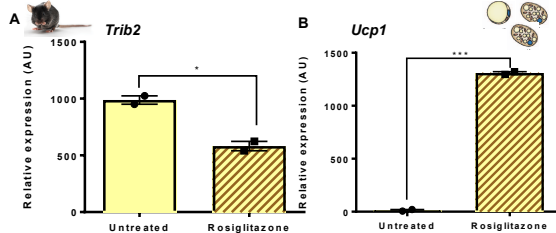


Figure 3 – *Trib2* ($p=0.02$) (A) and *Ucp1* ($p=0.0006$) (B) levels in mouse primary preadipocytes from inguinal WAT untreated or treated with rosiglitazone (n=2 each group).

4. *Trib2* expression is increased in brown adipocytes from PGC1 α null mice

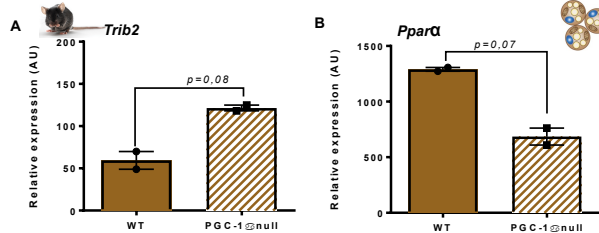


Figure 4 – *Trib2* (A) and *Pparalpha* (B) expression levels in differentiated brown adipocytes from PGC1 α null mouse (n=2 each group). PPAR α levels were used as control.

5. Discussion

This study reveals that *Trib2* is preferentially expressed in WAT compared to BAT, where it might play an important role in fat accumulation and inflammation in obesity. Because WAT's *Trib2* levels were decreased in response to rosiglitazone treatment, a PPAR γ agonist, whereas increased in PGC1 α null mice, *Trib2* might be a target of these factors, which direct or indirectly might negatively regulate its expression. However, since *Trib2* was increased in response to cold, it could be somehow involved in BAT thermogenesis.

REFERENCES

- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P & Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1293–1307.
- Hegeudus Z, Czirbula A, Kiss-Toth E. Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal.* 2007;19(2):238-250.
- Hill R, Madureira PA, Ferreira B, et al. TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT. *Nat Commun.* 2017;8:14687.
- Link W. Tribbles breaking bad: TRIB2 suppresses FOXO and acts as an oncogenic protein melanoma. *Biochem Soc Trans.* 2015;43(5):1085-1088.
- Naiki T, Saijou E, Miyaoka Y, Sekine K, Miyajima A. TRIB2, a Mouse Tribbles Ortholog, Suppresses Adipocyte Differentiation by Inhibiting AKT and C/EBP. *J Bio Chem.* 2007;282(33):24075-24082.
- Rodrigues-Viegas V, Link W, De Sousa-Coelho AL. Análise da expressão de TRIB2 em tecidos sensíveis à insulina associados à obesidade. *Rev Port Diabetes.* 2019;14(1).

