



**Universidade do Algarve**

*Estudo comparativo e caracterização de novos  
elementos na regulação da homeostasia da glicose em  
teleósteos*

**Carina Alexandra Vaz da Costa**

**Dissertação de Mestrado em Biotecnologia**

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Dr. João CR Cardoso

Co-orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Deborah M Power

**2014**



# Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia  
CCMAR, Laboratório Endocrinologia Comparativa e Biologia  
Integrada

## *Estudo comparativo e caracterização de novos elementos na regulação da homeostasia da glicose em teleósteos*

**Tese apresentada para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia**

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.”

Assinatura: \_\_\_\_\_

Indicação de «Copyright»

A Universidade do Algarve não poderá publicar e tornar público esta tese sem o consentimento do orientador, co-orientadora e autora.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer essencialmente aos meus orientadores mais diretos, Doutor João Cardoso e à Professora Deborah Power pelo constante empenho e dedicação em ensinar-me algo novo e motivar-me para que conseguisse alcançar os objetivos propostos inicialmente.

Um agradecimento à Rute Félix pela preciosa ajuda no q-RT-PCR e na componente gráfica do trabalho. Muito obrigada pela constante paciência, disponibilidade e pelos ensinamentos transmitidos.

Agradecer também à Marlene Trindade pelo apoio demonstrado sempre que necessitava, tanto em aspetos práticos como teóricos.

Agradecimento também especial ao Pedro Palma e Professor Adelino Canário pela disponibilidade em facultar as amostras da experiência em robalo.

A todos os colegas do laboratório 2.28.

## Resumo

A glicose é uma fonte importante de energia. Em mamíferos, o equilíbrio dos níveis de glicose no plasma sanguíneo, é regulado por mecanismos de *feedback* que envolve a insulina e o *glucagon*. Em peixes, o mecanismo de regulação da glicose e o papel do *glucagon* e seus recetores são pouco conhecidos. O objetivo deste trabalho consiste em identificar e caracterizar a evolução dos recetores e péptidos ligandos da família do *glucagon* em peixes e determinar qual o seu papel funcional através da caracterização da sua distribuição tecidual e identificar alvos envolvidos na regulação da glicose em peixes focando nos seus recetores.

Genes homólogos aos de mamíferos foram encontrados em vários peixes sugerindo que os recetores e ligandos da família do *glucagon* surgiram cedo no processo evolutivo. Análise filogenética sugere que os recetores e péptidos sofreram diferentes pressões evolutivas e isto afetou a evolução dos pares hormona-recetor. Entre peixes o número de genes identificados é bastante variável e dependente da espécie, e os genes para o recetor do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIPR) e para o recetor do péptido relacionado com o *glucagon* GCRPR foram identificados apenas em algumas espécies. Análise de sintenia de genes entre regiões homólogas para o GIPR e seu péptido ligando o polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP) de peixes com outros vertebrados demonstrou que em peixes a evolução destes genes foi muito dinâmica e sujeita a diferentes pressões seletivas que potencialmente levaram à sua eliminação do genoma.

Estudos de distribuição tecidual sugerem que em tilápia o recetor do *glucagon* GCGRa é mais abundante no fígado, o GCGRb no cérebro, o GLP2R no duodeno. O GIP apresenta uma distribuição semelhante em todos os tecidos analisados e GCRPR só se encontra presente no cérebro, duodeno, fígado e gónadas. Comparação da expressão relativa dos recetores em robalos sujeitos a um período de jejum de 48h para provocar modificações nos níveis de glicose no plasma não permitiu concluir sobre o papel dos recetores na regulação da glicose embora a expressão do GCGRb seja a mais afetada no cérebro.

**Palavras - chave:** glicose, *glucagon*, GPCRs, peixes, evolução, função

## Abstract

Glucose is the most important simple sugar in vertebrate metabolism. In mammals, glucose homeostasis in blood plasma is regulated by the pancreatic peptides, insulin and glucagon, that through feedback mechanisms are responsible for homeostasis of plasma glucose. In other vertebrates the regulation of glucose appears to be similar to what occurs in mammals with the exception of fish in which mechanisms of glucose regulation are still relatively poorly characterised. The aim of the present study was to use comparative approaches to identify and characterize some of the important elements of glucose metabolism in fish. More specifically the evolution of receptors and ligands of the glucagon family of peptides in fish was characterised and an experimental study performed to assess their potential role in glucose regulation in teleosts.

Homologue genes of glucose regulatory factors in mammals were found in several fish suggesting that the receptors and ligands of the glucagon family arose early in the evolutionary process. Phylogenetic analysis suggests that the receptors and peptides were under divergent pressures and that this affected the evolution of hormone-receptor pairs. The number of glucagon family genes identified between fish was highly variable and species specific and the gene for Gastric Inhibitory Polypeptide receptor (GIPR) and Glucagon-related peptide receptor (GCRPR) was only identified in some fish genomes. Gene synteny analysis between homologous regions for GIPR and its peptide ligand, GIP, revealed that the evolution of these genes was very dynamic and they were subject to very different selective pressures in the different lineages and this may explain why they were eliminated from the genomes of some species.

Tissue distribution studies suggest that in tilapia GCGRa is most abundant in the liver, GCGRb in the brain and GLP2R in the duodenum. The expression of GIPR was very similar in all tissues analysed but GCRPR was found expressed in the brain, duodenum, liver and gonads. Comparison of the relative expression of glucagon receptors in seabass that were starved for 48h failed to reveal correlations between receptor expression and the decrease of plasma glucose levels. The results failed to conclusively demonstrate a role for the glucagon system in glucose homeostasis in the sea bass and to establish if this is a teleost specific phenomenon further studies will be required.

**Keywords:** glucose, *glucagon*, GPCRs, fish, evolution, function

## Abreviaturas

**aa** - Aminoácidos

**AMPc** - Adenosina Monofosfato cíclica

**ATP** - Adenosina trifosfato

**° C** - Graus Celsius

**cDNA** - DNA complementar

**DNA** - Ácido desoxiribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

**dNTP** - Desoxiribonucleótidos 5-trifosfatados

**DPP4** - *Dipeptidil peptidase 4*

**EST** - *Expressed Sequence Tag*

**Fwd** – *Forward*

**GCG** - Glucagon

**GCGR** - Recetor do glucagon

**GCRP** - *Glucagon related peptide*

**GCRPR** - Recetor GCRP

**GHRHR** - *Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor*

**GIP** - *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*

**GIPR** - Recetor GIP

**GLP1, 2** - *Glucagon-Like Peptide 1, 2*

**GLP1R** - Recetor GLP1

**GLP2R** - Recetor GLP2

**GLUT** - Transportador de glicose (*Glucose transporter*)

**GPCR** - Recetores acoplados à proteína G (*G-Protein Coupled Receptors*)

**GTP** - Guanosina-5'-trifosfato

**IP<sub>3</sub>** - Inositol 1,4,5-trifosfato

**IPTG** - Isopropyl-β-tiogalactopiranósido

**Kg** - Kilograma

**L** - Litro

**Mb** - Megabases

**mg** - Miligrama

**min** - minutos

**ml** - Mililitro

**mmol** - Milimol

**ng** - Nanograma

**nm** - Nanómetro

**nM** - Nanomolar

**NMR** - *Nuclear Magnetic Resonance*

**pb** - Pares de bases

**PC** - Prohormona Convertase

**PKA** - Proteína cinase A

**pmol** - Picomol

**PTHr** - *Parathyroid Hormone Receptor*

**Rev** - *Reverse*

**RNA** - Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

**RNA<sub>m</sub>** - RNA mensageiro

**RNA<sub>se</sub>** - Ribonuclease

**rpm** - Rotações por minuto

**1R/2R** - 1ª duplicação/ 2ª duplicação do genoma

**Seg** - segundos

**TM** - Transmembranar

**U** - Unidade

**X-gal** - 5-Bromo4-Chloro3-Indolyl β-D-Galactopyranoside

**λ** - Comprimento de onda

**μg** - Micrograma

## Índice

Agradecimentos	III
Resumo	IV
Abstract	V
Abreviaturas	VI
Índice	VIII
Índice de Tabelas	XI
Índice de Figuras	XII
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Regulação da glicose em mamíferos	3
1.2 Membros da família do <i>Glucagon</i>	4
1.2.1 <i>Glucagon</i> e péptidos relacionados	5
1.2.1.1 O precursor <i>proglucagon</i>	5
1.2.1.2 O péptido <i>glucagon</i> (GCG)	6
1.2.1.3 O péptido <i>Glucagon-like 1</i> (GLP-1)	7
1.2.1.4 O péptido <i>Glucagon-like 2</i> (GLP-2)	8
1.2.2 O péptido <i>Glucose Insulinotropic</i> (GIP)	9
1.2.3 O péptido <i>Glucagon-related</i> (GCRP)	9
1.3 Recetores do <i>glucagon</i> e péptidos relacionados	10
1.3.1 Estrutura dos recetores	10
1.3.2 Distribuição e função dos recetores da família do <i>glucagon</i> em mamíferos	12
1.4 Evolução da família do <i>glucagon</i> e seus recetores	14
1.5 O papel do <i>glucagon</i> e seus recetores na homeostasia da glicose em peixes	15
1.6 Contextualização do trabalho no âmbito da biotecnologia	18
<b>2. Objetivos</b>	<b>20</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>21</b>
3.1 Análise bioinformática	21
3.1.1 Pesquisas <i>in silico</i> em bases de dados	21
3.1.2 Pesquisas em bases de dados de genomas	22
3.1.3 Pesquisas em bases de dados de ESTs	23

3.1.4 Alinhamentos múltiplos de sequências	23
3.1.5 Análise filogenética	24
3.1.6 Caracterização do ambiente genómico	25
3.2 Amostragem e métodos experimentais de biologia molecular	25
3.2.1 Escolha das espécies e recolha de tecidos	25
3.2.2 Métodos experimentais de biologia molecular	26
3.2.2.1 Extração do RNA	26
3.2.2.2 Tratamento do RNA	27
3.2.2.3 Síntese de cDNA	27
3.2.2.4 Desenho de <i>primers</i>	28
3.2.2.5 PCR-Reação em cadeia da polimerase (PCR)	28
3.2.2.6 Eletroforese em gel de agarose	31
3.2.2.7 Extração e purificação do DNA de uma banda de um gel de agarose	31
3.2.2.8 Reação de ligação	32
3.2.2.9 Transformação bacteriana e seleção de clones transformados	32
3.2.2.10 Extração de DNA plasmídeo	33
3.3 Quantificação de glicose no plasma	34
3.4 Análise estatística	34
<b>4. Resultados</b>	<b>35</b>
4.1 Identificação dos diferentes recetores da subfamília do <i>glucagon</i> em peixes	35
4.1.2 Análise filogenética	37
4.1.3 Análise comparativa de sequências de recetores em peixes	39
4.1.3.1 Similaridade e identidade	39
4.1.3.2 Motivos conservados	41
4.2 Péptidos precursores da família GCG/GLP e GIP em peixes	42
4.2.1 Análise filogenética	46
4.2.2 Análise comparativa de sequências de ligandos em peixes	48
4.2.2.1 O <i>Proglucagon</i> em peixes	50
4.2.2.2 O precursor do GIP em peixes	51
4.2.2.3 O precursor do GCRP em peixes	51
4.3 Análise de linkage	52
4.4 Distribuição tecidular dos diferentes recetores da subfamília <i>glucagon</i> em peixes	57
4.5 Distribuição dos recetores da subfamília glucagon em relação aos níveis de glicose no plasma em peixes	59

<b>5. Discussão</b>	<b>62</b>
5.1 Evolução dos recetores e péptidos ligandos do sistema glucagon em peixes	62
5.2 Papel funcional dos recetores da família do glucagon em peixes	65
<b>6. Conclusões</b>	<b>71</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>72</b>
<b>8. Anexos</b>	<b>79</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Principais bases de dados consultadas, durante as pesquisas de bioinformática para recolha de sequências	22
<b>Tabela 2.</b> Lista de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR	30
<b>Tabela 3.</b> Percentagem de identidade/similaridade entres os recetores da família do GCGR/GLP1R/GIPR de tilápia com os recetores homólogos de robalo, takifugu e peixe zebra	40
<b>Tabela 4.</b> Percentagens de identidade e similaridade dos recetores de tilápia com os recetores homólogos em humano, <i>Xenopus</i> , celacanto, <i>spotted gar</i> , lampreia e Ciona	41
<b>Tabela anexo 1.</b> Tabela com números de acesso da família dos recetores <i>glucagon</i> em diferentes espécies	80
<b>Tabela anexo 2.</b> Tabela com os Ests dos recetores da família <i>glucagon</i> pesquisados em diferentes espécies	81
<b>Tabela anexo 3.</b> Percentagens de identidade e similaridade da sequência completa de proteína deduzida dos recetores da subfamília do <i>glucagon</i> em Tilápia	82
<b>Tabela anexo 4.</b> Tabela com números de acesso dos péptidos da família <i>glucagon</i>	83
<b>Tabela anexo 5.</b> Tabela com os Ests dos péptidos ligados da família glucagon	84
<b>Tabela anexo 6.</b> Percentagens de identidade e similaridade do ligando GCG	85
<b>Tabela anexo 7.</b> Percentagem de identidade e similaridade para o GIP	86
<b>Tabela anexo 8.</b> Percentagem de identidade e similaridade para o péptido preditivo GCRP	86
<b>Tabela anexo 9.</b> Percentagens de identidade e similaridade do péptido maduro GGC	87
<b>Tabela anexo 10.</b> Percentagens de identidade e similaridade do péptido GLP-1	88
<b>Tabela anexo 11.</b> Percentagens de identidade e similaridade do péptido GLP-2	89
<b>Tabela anexo 12.</b> Percentagens de identidade e similaridade quando se considera apenas a sequência do péptido GIP	89
<b>Tabela anexo 13.</b> Percentagens de identidade e similaridade quando se considera apenas a sequência do péptido GCRP	90

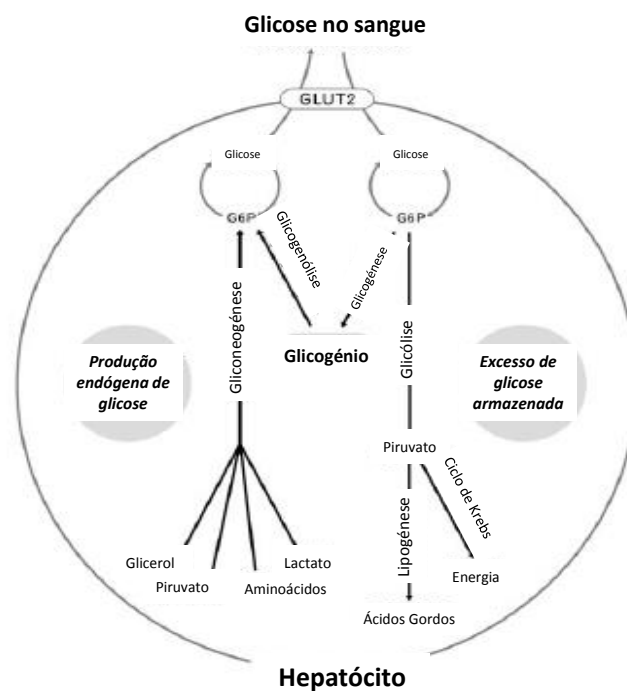
## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das principais vias metabólicas, envolvidas no metabolismo da glicose no hepatócito	1
<b>Figura 2.</b> Variação dos níveis de glicose no plasma em vertebrados	2
<b>Figura 3.</b> Comparação geral das estruturas da proteína precursora do péptido GIP (proGIP) e dos péptidos GCG, GLP1 e GLP2 (proGlucagon) em humano	5
<b>Figura 4.</b> Representação geral do gene e péptidos bioativos resultantes do proglucagon em humano	6
<b>Figura 5.</b> Esquema representativo do efeito das incretinas (GLP-1 e GIP) em resposta à ingestão de alimentos no pâncreas	8
<b>Figura 6.</b> Estrutura geral dos recetores acoplados a proteínas G (GPCRs) na membrana celular	10
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática das vias de sinalização desencadeadas pela interação do GLP-1 e GIP	11
<b>Figura 8.</b> Relação filogenética entre os membros da família GCGR/GLPR/GIPR com os outros recetores da família 2 GPCRs ou família das secretinas	13
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da evolução do precursor <i>proglucagon</i> em vertebrados	15
<b>Figura 10.</b> Variação da percentagem de aumento da glicemia em mamíferos e em diferentes peixes	16
<b>Figura 11.</b> Variação da glicémia em mamíferos e em peixes (truta)	17
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática da metodologia seguida ao longo do decorrer do trabalho experimental	21
<b>Figura 13.</b> Número de membros de recetores da subfamília do <i>glucagon</i> identificados nos genomas de peixes	36
<b>Figura 14.</b> Árvore filogenética obtida com o método de <i>maximum likelihood</i> dos diferentes recetores da subfamília do <i>glucagon</i> , de peixes outros vertebrados e homólogos em <i>Ciona</i> e anfíoxo.	38
<b>Figure 15.</b> Alinhamento de sequências de aminoácidos dos 5 recetores de tilápia	43
<b>Figura 16.</b> Número de membros da família dos GCG/GLPs e GIP identificados nos genomas de peixes	44
<b>Figura 17.</b> Árvore filogenética obtida com o método de <i>maximum likelihood</i> dos	47

membros da família do GCG/GLP e GIP de peixes e outros vertebrados	
<b>Figura 18.</b> Alinhamento múltiplo da sequência deduzida do péptido maduro dos membros da família do GCG, GLP e GIP identificados em peixes com os homólogos em humano e galinha	49
<b>Figura 19.</b> Esquema representativo da análise de sintenia de ambiente genómico para o GIPR	54
<b>Figura 20.</b> Esquema representativo da análise de sintenia de gene do ambiente genómico do GIP	56
<b>Figura 21.</b> Esquema representativo da análise de ambiente genómico entre o GCGR/GLP identificados no invertebrado <i>Ciona</i> e vertebrados <i>spotted gar</i> e humano	57
<b>Figura 22.</b> Distribuição tecidular dos diferentes recetores da subfamília do <i>glucagon</i> por PCR quantitativo em tilápia	58
<b>Figura 23.</b> Gráfico com a variação dos níveis de glucose no plasma dos peixes usados	60
<b>Figura 24.</b> Distribuição relativa da expressão dos recetores GCGRa, GCGRb e GIPR, em relação aos níveis de glicose no plasma em robalo	61
<b>Figura anexo 1.</b> Alinhamento de sequências de aminoácidos do recetor GCGR/GCGRa e GCGRb/GLP1R	91
<b>Figura anexo 2.</b> Alinhamento de sequências de aminoácidos do recetor GLP2R	93
<b>Figura anexo 3.</b> Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos do recetor GIPR	94
<b>Figura anexo 4.</b> Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos do recetor GCRPR	95
<b>Figura anexo 5.</b> Alinhamento das sequências em aminoácidos do proglucagon, com indicação dos péptidos GLP1 e GLP2	96
<b>Figura anexo 6.</b> Alinhamento da sequência preditiva em aminoácidos da hormona GIP	97
<b>Figura anexo 7.</b> Alinhamento da sequência prevista em aminoácidos do péptido GCRP	98

## 1. Introdução

A glicose é uma fonte de energia importante para todos os vertebrados. Existe continuamente em circulação no sangue e é essencial para o metabolismo energético dos tecidos. A glicose é geralmente obtida por absorção gastrointestinal após a ingestão de alimentos ou através de produção endógena por metabolização do glicogénio (**Figura 1**). Os níveis de glicose no plasma são estritamente regulados, por fatores endócrinos para manter a homeostasia e dependem de vários fatores externos tal como a alimentação, a temperatura corporal e o nível de stress, entre outros (Yeo et al., 2013, Giugliano et al., 2008).

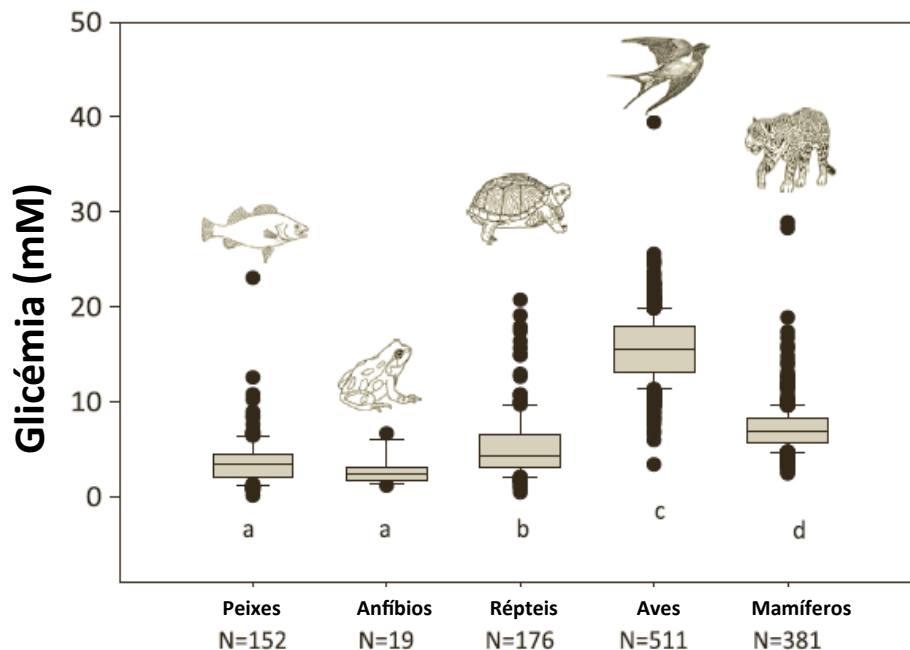


**Figura 1. Representação esquemática das principais vias metabólicas, envolvidas no metabolismo da glicose no hepatócito de mamíferos.** Quando há excesso de glicose esta é armazenada sob a forma de glicogénio (glicogénese) ou é degradada (glicólise) para a produção de ácidos gordos (lipogénese) ou de energia por ativação do ciclo de Krebs. Quando há falta de glicose é necessária a produção de glicose endógena (gliconeogénese, glicogénólise). GLUT2 são importantes transportadores de glicose. (retirado de Enes et al., 2008)

Estudos sobre a regulação da glicose em vertebrados datam do início do século XX e a insulina foi o primeiro fator endócrino identificado. Os estudos iniciais foram realizados por Banting, Macleod e Best que verificaram que os extratos de pâncreas tinham a capacidade de regular os níveis de glicose evidenciando sobre a existência de um mecanismo regulatório. No entanto, só mais tarde com os trabalhos realizados por Collip et al., é que a insulina foi purificada e se reconheceu a existência de um mecanismo interno que perante um aumento de

glicose no sangue, promove a síntese e liberação desta hormona pelo pâncreas (Rosenfeld, 2002).

Em 1929, La Barre através da purificação de extratos de intestino verificou que existia um sistema fisiológico em que elementos baixavam os níveis de glicose no plasma e designou-os de Incretinas (INtestine seCRETtion Insulin) (Zunz e La Barre, 1929). No final de 1960 os investigadores Perley e Kipnis concluíram que após a ingestão de alimentos e durante a digestão gastrointestinal são libertadas hormonas peptídicas que estimulam a produção de insulina (Baggio et al., 2007). A primeira hormona incretina a ser identificada, foi o Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) libertado pelas células K do intestino delgado, e desde então vários fatores endócrinos que participam na regulação da glicose foram consequentemente isolados (Kim et al., 2008). O GIP é um péptido da família do *glucagon* e os membros desta família têm um papel fundamental na regulação e na manutenção dos níveis fisiológicos de glicose no plasma em vertebrados. Apesar de nem todas as classes de vertebrados dependerem e utilizarem a glicose da mesma maneira, todos eles possuem mecanismos que monitorizam e regulam os níveis de glicose no plasma (**Figura 2**).



**Figura 2. Variação dos níveis de glicose no plasma em vertebrados.** O gráfico representa os níveis de glicemia (mM) em diferentes representantes de várias classes de vertebrados: peixes (n = 11 espécies), anfíbios (n = 2 espécies), répteis (n = 14 espécies), aves (n = 20 espécies) e mamíferos (n = 22 espécies). O N representa o número de indivíduos analisado. As aves e os répteis são em geral, os grupos taxonômicos em que as concentrações de glicemia são mais elevadas (retirado de Polakof et al., 2011).

Em peixes, os estudos sobre a regulação da glicose são controversos e, apesar de se pensar inicialmente que estes são intolerantes à glicose alguns estudos revelaram a existência de um mecanismo de regulação semelhante aos outros vertebrados (Thorpe e Ince, 1976; Emdin, 1982, Ronner e Scarpa, 1987, Plisetskaya and Duan, 1994) e que a glicose estimula a produção de insulina (Polakof et al., 2011). A caracterização do mecanismo associado ao sistema endócrino do *glucagon* e seus recetores é o principal objeto de estudo deste projeto.

## 1.1 Regulação da glicose em mamíferos

Em mamíferos, os níveis de glicose aumentam quando ingerimos alimentos ricos em hidratos de carbono, e diminuem durante períodos de jejum. Uma das formas de regular a concentração de glicose no sangue é a captação desta para os tecidos onde é utilizada como fonte de energia seguindo a via glicolítica, mas também recorrendo à síntese de glicogénio (glicogénese) e seu armazenamento principalmente no fígado (**Figura 1**). Numa fase de jejum o organismo mantém a glicémia recorrendo à glicogenólise, que consiste na degradação do glicogénio e ocorre essencialmente no fígado (95%) e em pequena parte no rim (5%) (Maggs et al., 2008) (**Figura 1**). Em jejuns prolongados a produção de glicose é feita também a partir de lactato, piruvato, aminoácidos e glicerol, processo designado por gliconeogénese que também ocorre a nível do fígado e rins (Bano, 2013) (**Figura 1**).

A manutenção dos níveis fisiológicos de glicose depende de uma estrita conjugação entre fatores humorais, sistema nervoso autónomo, estado nutricional e sistema endócrino (Giugliano et al., 2008; Polakof et al., 2011). O cérebro utiliza a glicose como principal fonte de energia mas tem um pequeno armazenamento. O cérebro, o fígado, o rim e o músculo são órgãos importantes na regulação da homeostasia da glicose, no entanto o pâncreas é o responsável pela síntese e libertação de insulina e *glucagon*, as principais hormonas que participam no controlo dos níveis de glicose e têm efeitos antagónicos (Bano, 2013). A função endócrina do pâncreas cabe essencialmente aos diferentes tipos de células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e as células *pancreatic polypeptide* (PP) que constituem os Ilhéus de *Langerhans*. A insulina é produzida pelas células  $\beta$ , o glucagon é produzido pelas células  $\alpha$ , as  $\delta$  produzem somatostatina e o polipeptídeo pancreático é produzido pelas células PP, este participa na regulação da função gastrointestinal, inibe o pâncreas exócrino e reduz a libertação da somatostatina (Oh et al., 2012). A regulação do metabolismo da glicose envolve além de um controlo por feedback “bidirecional”, entre a insulina e o *glucagon*, o eixo entero-insular (que relaciona o intestino

com as células pancreáticas), como sistema de detecção dos níveis fisiológicos de glicose (Bano, 2013).

A glicose é o principal estímulo para a secreção de insulina. Quando os níveis de glicose no sangue aumentam, aumenta também a síntese da insulina.

O transporte de glicose para os tecidos é feito por proteínas transportadoras específicas os GLUTs, e existem cerca de 14 GLUTs caracterizados que se encontram distribuídos por diferentes tecidos. O GLUT 2 permite, por exemplo, que a glicose chegue as células  $\beta$  do pâncreas e aos hepatócitos e o GLUT 4 é o principal transportador de glicose estimulado pela insulina (Jordan et al., 2010). A insulina é uma hormona peptídica constituída por 51 aminoácidos sintetizada ao nível do retículo endoplasmático rugoso, que se encontra armazenada em vesículas secretoras onde ocorre a sua maturação. Esta hormona apresenta uma semivida curta em circulação (cerca de 5 minutos) e permite diminuir os níveis de glicose atuando em vários órgãos. No fígado, promove a síntese de glicogénio, a estimulação da glicólise, e a inibição da gliconeogénese e outras ações anabólicas como síntese de ácidos gordos evitando a degradação de proteínas; no tecido adiposo aumenta a captação de glicose; no músculo estimula a captação de aminoácidos para síntese de proteínas e captação de glicose para formar glicogénio; no cérebro pensa-se ter um efeito modulador sobretudo ao nível da ingestão de alimentos (Anand, B et al., 1964, Woods et al., 2006).

Quando elevados níveis de glicose persistem no sangue contribuem para uma diminuição da resposta por parte das células  $\beta$ , conduzindo a situações de hiperglicemias. A ação da insulina é mediada por um recetor específico que permite a ativação ou inibição de enzimas ou de outras hormonas que participam no metabolismo da glicose, contudo, iremos dar mais importância aos membros da família do *glucagon* (Woods et al., 2006).

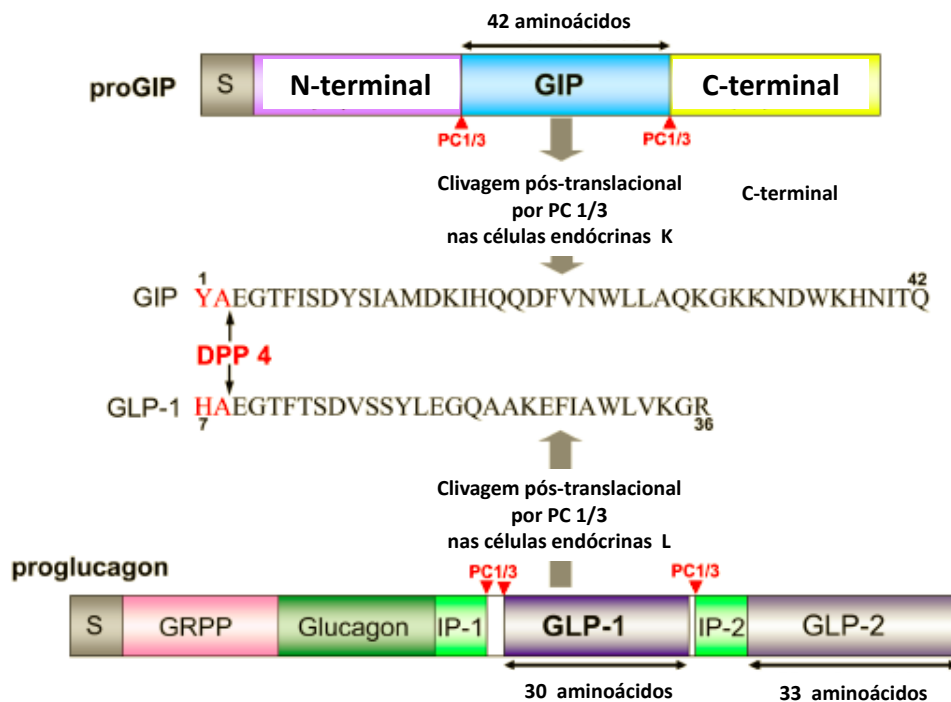
## 1.2 Membros da família do *Glucagon*

Em mamíferos existem quatro hormonas que pertencem à família do *glucagon*: o GCG (*Glucagon*), o GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1*), o GLP-2 (*Glucagon-like peptide 2*) e o GIP (*Glucose Insulinotropic Peptide*). Todas estas hormonas estão envolvidas na regulação da glicose tendo o GCG um papel antagónico à insulina e o GLP-1 e o GIP são os responsáveis pela secreção de cerca de 50-70% da insulina em resposta a glicose ingerida. Ao GLP-2 estão associadas funções importantes ao nível do intestino mas, maioritariamente, o seu papel permanece por desvendar (Baggio et al., 2007).

## 1.2.1 Glucagon e péptidos relacionados

### 1.2.1.1 O precursor proglucagon

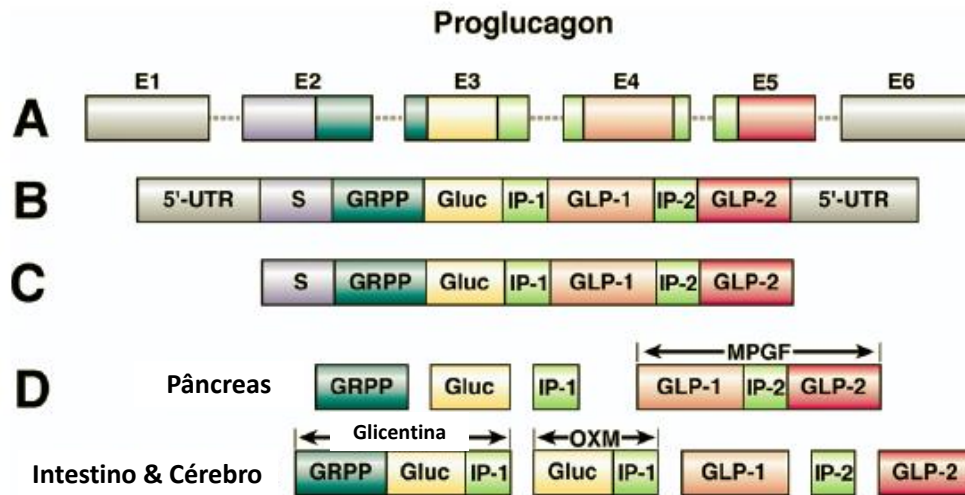
O *proglucagon* é o precursor peptídico para as hormonas *glucagon*, GLP-1 e GLP-2. O GLP-1 e GLP-2 apresentam 50% de homologia com o *glucagon* e a sua produção resulta de um processo de pós-transdução proteolítica e depende do tipo de tecido (pâncreas, intestino ou cérebro) (**Figura 3 e 4**). A prohormona convertase (PC) é a enzima responsável pela clivagem dos vários péptidos. A PC2 está envolvida na origem do *glucagon*, enquanto que a ação do PC1 e 3 permite o aparecimento dos péptidos GLP-1 e GLP-2 (Marathe et al., 2013). Estudos em modelos roedores indicam que durante o jejum e em estado de hipoglicémias existe uma sobre-expressão do *proglucagon* no pâncreas (Baggio et al., 2007, Marathe et al., 2013), no intestino a expressão deste gene aumenta após alimentação e diminuiu com o jejum (Hoyt et al., 1996, Marathe et al., 2013) (**Figura 3 e 4**).



**Figura 3. Comparação geral das estruturas da proteína precursora do péptido GIP (proGIP) e dos péptidos GCG, GLP-1 e GLP-2 (proGlucagon) em humano.** As regiões da molécula que contém os péptidos no precursor estão representadas por cores e os locais de clivagem proteolítica por ação da endoproteínases PC (proconvertases) que são responsáveis pela libertação dos péptidos maduros do precursor estão indicados. A DPP4 é a enzima que é responsável pela degradação dos péptidos maduros e conseqüente inativação do seu papel biológico (retirado de Kim et al., 2008).

Em humanos o *proglucagon* é constituído por 180 aminoácidos e o seu gene é composto por 6 exões e 5 intrões (**Figura 4**). O péptido GCG encontra-se codificado no exão

3, o GLP-1 no exão 4 e o GLP-2 no exão 5. Neste precursor está ainda codificado o péptido *Glicentin-related peptide* (GRPP) entre os exões 2 e 3 e que é sintetizado no pâncreas, mas que ao nível do intestino é traduzido conjuntamente com o *glucagon* e o péptido resultante designa-se de glicentina (**Figura 4**) (Marathe et al., 2013, Kim et al., 2008).



**Figura 4. Representação geral do gene e péptidos bioativos resultantes do proglucagon em humano.** (A) Estrutura do gene, onde os exões que contém os péptidos maduros estão representados por caixas coloridas; (B) RNAm resultante da transcrição do gene; (C) precursor proteico, (D) péptidos resultantes da clivagem proteolítica no pâncreas e no intestino/cérebro (retirado de Baggio et al., 2007).

### 1.2.1.2 O péptido *glucagon* (GCG)

O *glucagon* é uma hormona peptídica constituída por 29 aminoácidos. Em humano, a estimulação da síntese de *glucagon* é desencadeada pelos baixos níveis de glicose, mas também por catecolaminas e glucocorticóides. Pelo contrário a inibição da sua síntese é regulada maioritariamente pela insulina mas também pela hormona somatostina quando os níveis de glicose são elevados (Yeo et al., 2013). A principal ação do *glucagon* é ao nível do fígado, através da captação de aminoácidos, da gliconeogénese com libertação de glicose, e da inibição da síntese de ácidos gordos e da glicólise (Habegger et al., 2010). O GCG é produzido não só no pâncreas (nas células  $\alpha$  dos ilhéus de *Langerhans*), mas também no intestino, nomeadamente, nas células enteroendócrinas L, da zona distal do intestino delgado e cólon, e no sistema nervoso central (Marathe et al., 2013).

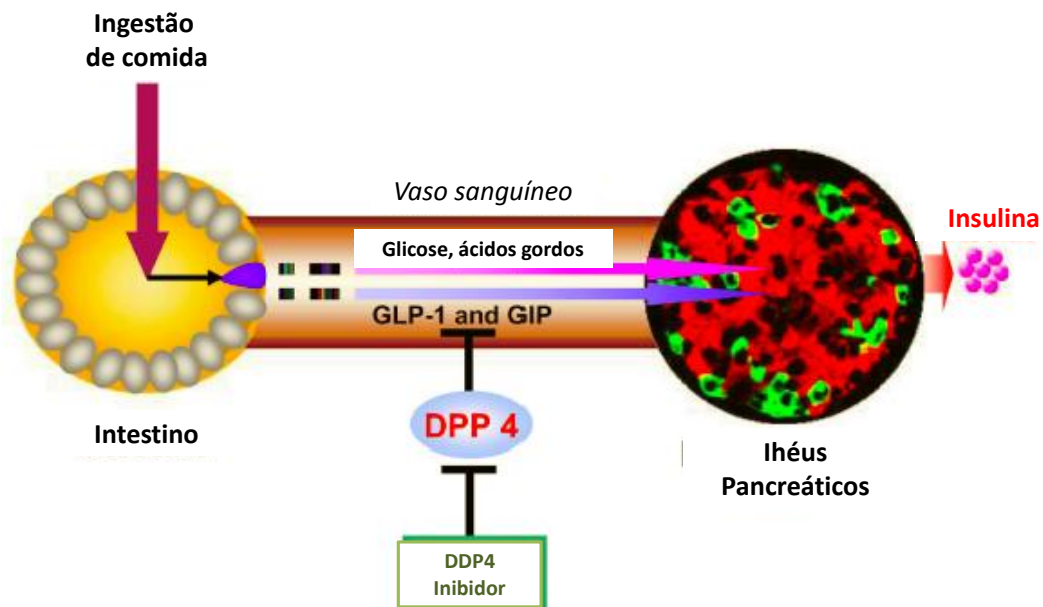
A terapêutica com *glucagon* apenas é utilizada em episódios agudos de hipoglicémia em doentes com diabetes *mellitus* (DM) tipo I, e como relaxante muscular do esófago para

exames radiológicos, ou para facilitar exames intestinais. Estudos recentes também apontam o glucagon para tratamento de dislipidémias dado o seu envolvimento no metabolismo dos lípidos (Kim et al., 2008, Habegger et al., 2010).

### 1.2.1.3 O péptido *Glucagon-like 1* (GLP-1)

O GLP-1 foi a segunda incretina a ser descrita em 1985. Em humano e outros mamíferos é constituída por 31 aminoácidos (**Figura 3**) e é produzida nas células enteroendócrinas L do íleo distal e do cólon e a secreção desta hormona estimula o aumento dos níveis de insulina no plasma (**Figura 5**). O GLP-1 diminuiu a ingestão de comida, inibe o esvaziamento gástrico, e impede a secreção do *glucagon* (Baggio et al., 2007, Marathe et al., 2013). Este péptido favorece a glicogénese nas células hepáticas, e no músculo, permite através de mecanismos neurais a distribuição da glicose (Burcellin et al., 2001, Kim et al., 2008). Os efeitos extrapancreáticos do GLP-1 em mamíferos são ao nível do sistema nervoso central, periférico, trato gastrointestinal, músculo, tecido adiposo e fígado, tecido ósseo, sistema cardiovascular e eixo hipotálamo e pituitária (Marathe et al., 2013).

A secreção de GLP-1 após a ingestão de alimentos apresenta um pico inicial 10-15 minutos e posteriormente nos 30-60 minutos e tem funções semelhantes ao GIP. Estudos recentes têm demonstrado que a diabetes *mellitus* tipo 2 (DM 2) tem associados baixos níveis de GLP-1 (Salehi, M., 2008). Esta doença é caracterizada pelos elevados níveis de glicose, pela secreção reduzida de insulina e pela resistência periférica à insulina, e também por um aumento do *glucagon*, o que leva a produção endógena de glicose por parte do fígado. Contudo, estudos demonstram que a administração de GLP-1 conduz à normalização dos níveis de glicose no plasma, permite também um melhoramento da função das células  $\beta$ , ficando mais sensíveis a glicose, e contribuiu para restabelecer a primeira fase de secreção da insulina no pâncreas (Kim et al., 2008, Moon et al., 2012) (**Figura 5**). O GLP-1 é também apontado como importante agente terapêutico na obesidade uma vez que, ao nível do cérebro, a sua atuação pode inibir o apetite e está também associado a funções neuroprotectoras (Moon et al., 2012).



**Figura 5.** Esquema representativo do efeito das incretinas nos mamíferos (GLP-1 e GIP) em resposta à ingestão de alimentos no pâncreas. Nos ilhéus pancreáticos a verde estão representadas células  $\alpha$  que contém *glucagon* e a vermelho células  $\beta$  que contém insulina (retirado de Kim et al., 2008).

#### 1.2.1.4 O péptido *Glucagon-like 2* (GLP-2)

GLP2 é um péptido constituído por 33 aminoácidos (**Figura 3**) que faz parte da molécula *proglucagon*. Este péptido é secretado pelas células enteroendócrinas L, localizadas na região distal do intestino delgado e colon, em resposta à ingestão de alimentos nos mamíferos. Ao contrário do GLP-1 não é uma hormona incretina e estimula o aumento dos níveis de *glucagon* quer em jejum ou numa situação pós-pandrial (Meier et al., 2006, Marathe et al., 2013). Apresenta propriedades intestinoatrópicas e tem sido considerado um fator de crescimento intestinal. Após a ingestão de alimentos o pico de secreção do GLP-2 é aos 30-60 minutos, e novamente aos 90-120 minutos. O GLP-2 tem um tempo de semivida de 7 minutos, é eliminado ao nível renal, tal como o GLP-1. Em modelos animais, camundongos, o GLP-2 permite a proliferação de células intestinais, inibe a apoptose (Tsai et al., 1997), estudos de Hornby et al., 2011 indicam a participação deste péptido na redução das concentrações de marcadores inflamatórios. Em ratos reduz o esvaziamento gástrico e a ingestão de comida a curto prazo, contudo nos humanos esta ação não é tão evidente (Baldassano et al., 2012, Schmidt et al., 2003). A nível terapêutico o GLP-2 está a ser apontado sobretudo para doenças gastrointestinais, pela sua participação na regulação da

capacidade de absorção, mas também para tratamento de doenças inflamatórias do intestino (Marathe et al., 2013).

### 1.2.2 O péptido *Glucose Insulinotropic* (GIP)

O péptido GIP é codificado por outro gene e a sua ação foi inicialmente descrita por inibir a secreção do ácido gástrico em cães. O GIP humano é um péptido com 42 aminoácidos que é produzido nas células enteroendócrinas K do duodeno e do jejuno proximal (Baggio et al., 2007) (**Figura 3**). O GIP tem um efeito menos potente como incretina que o GLP-1 em mamíferos e a sua secreção é estimulada pela ingestão de comida rica em glicose ou ácidos gordos para promover o efeito insulínico, ou seja a estimulação da secreção de insulina (Meier et al., 2002) (**Figura 5**). Em comum com o GLP-1 partilha funções na proliferação das células  $\beta$  do pâncreas e na resistência à apoptose (Kim et al., 2008). Os níveis de GIP e GLP-1 aumentam no plasma após a ingestão de alimentos (a concentração do GIP depende do tipo e quantidade de comida ingerida e do estado de saúde), existem sinais endócrinos e neuronais promovem a síntese destes peptídeos antes que os alimentos estejam completamente digeridos (**Figura 5**) (Kim et al., 2008). Os níveis plasmáticos de GIP e GLP-1 diminuem muito rapidamente. A semivida do GIP é de 5-7 minutos e do GLP-1 é de 1 a 2 minutos e estes peptídeos são eliminadas pelo rim e fígado (Baggio et al., 2007, Drucker, 2006, Deacon, 2005).

Também são atribuídas ao GIP funções importantes ao nível do sistema nervoso central, uma vez que tanto o GIP e seu recetor são lá expressos, nomeadamente associados à proliferação celular. Outros efeitos extrapancreáticos do GIP têm sido verificados uma vez que tanto o GIP como o recetor já foram encontrados em diferentes tecidos, ao nível do trato gastrointestinal, tecido adiposo e do osso (Kim et al., 2008). Estudos realizados em mamíferos também sugerem o envolvimento do GIP na regulação do metabolismo dos lípidos e a sua utilização como potencial terapêutico para o tratamento da obesidade (Kim et al., 2012).

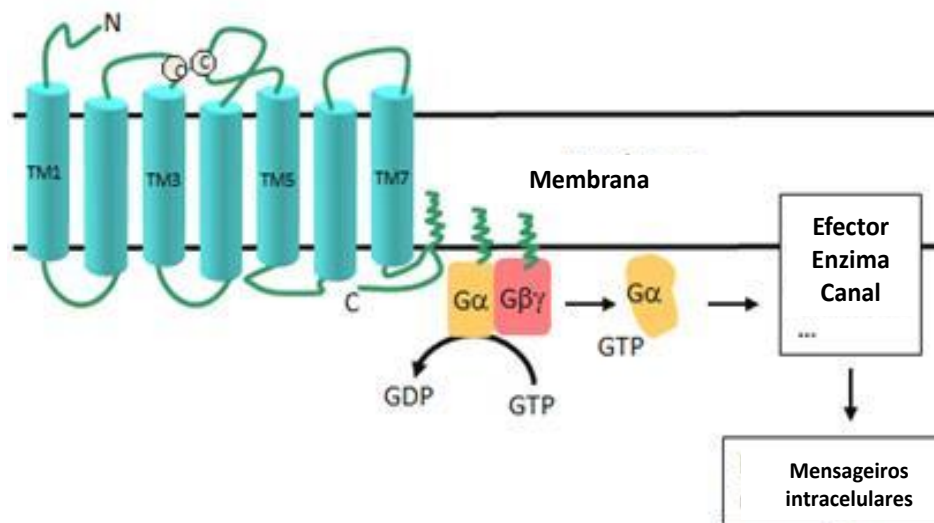
### 1.2.3 O péptido *Glucagon-related* (GCRP)

O GCRP (GCG-related peptide ou péptido relacionado com o *glucagon*) é um novo membro da família do *glucagon*. Este péptido foi recentemente identificado em alguns vertebrados tais como o largato, a galinha e no anfíbio *Xenopus*, e também foi identificado em alguns peixes teleósteos, tais como o *medaka*, *takifugu*, *tetraodon* e esgana-gata. No entanto o GCRP parece estar ausente no genoma de mamíferos. As funções deste péptido são muito pouco conhecidas, no entanto partilha elevada similaridade com o GLP-1 (Park et al., 2013).

### 1.3 Recetores do *glucagon* e péptidos relacionados

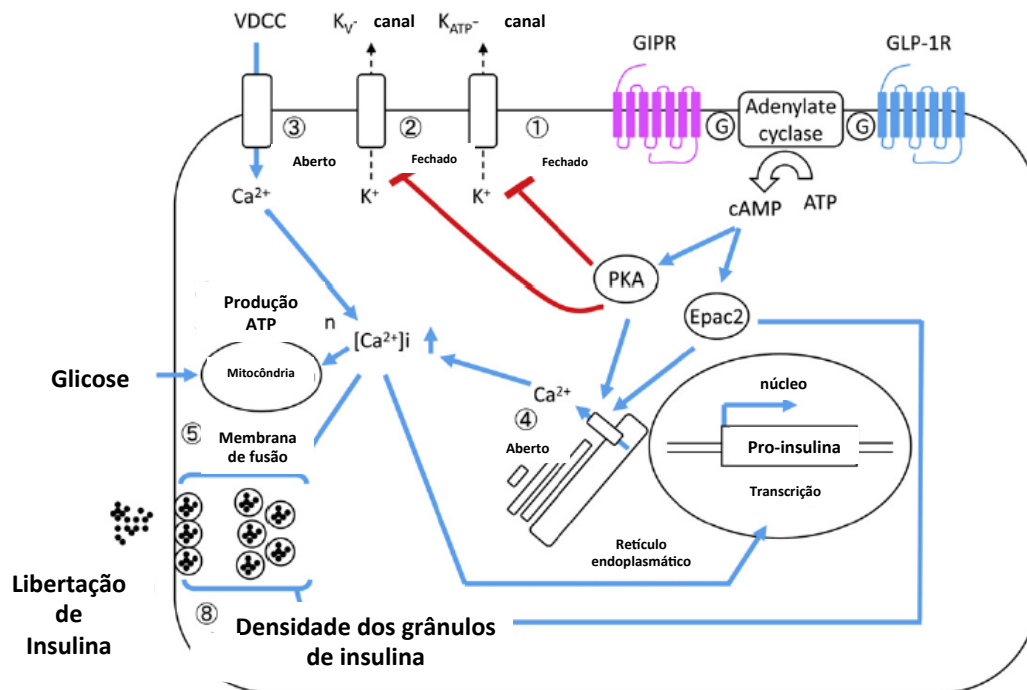
#### 1.3.1 Estrutura dos recetores

Os recetores acoplados a proteína G (GPCR), têm uma localização transmembranar e desempenham um papel crucial na transdução de sinal. Os GPCRs são caracterizados por serem em grande número e pela sua diversidade, permitem responder a uma grande variedade de sinais externos à célula (Katritch et al., 2012). Os recetores desta superfamília partilham uma estrutura conservada ao longo da evolução e constituem 1 a 2% do número total de genes humanos. Os GPCRs são constituídos por 7 regiões transmembranares muito conservadas que ligam o recetor à membrana celular e têm acoplado à região C-terminal uma proteína específica, a proteína G, que tem capacidade para ligar GTP (guanosina trifosfato) e GDP (Guanosina difosfato) e apresenta três subunidades ( $\alpha\beta\delta$ ) (**Figura 6**).



**Figura 6. Estrutura geral dos recetores acoplados a proteínas G (GPCRs) na membrana celular.** As sete regiões transmembranares (TM1 a 7) características dos GPCRs estão representadas bem como o domínio N-terminal que está localizado na região extracelular e é a principal região da molécula envolvida na ligação ao péptido. O domínio C-terminal encontra-se na região intracelular e interage com as subunidades do complexo de proteínas G para ativar os diferentes mensageiros intracelulares (retirado de [http://www.brown.edu/Research/Fly\\_Aging/research.htm](http://www.brown.edu/Research/Fly_Aging/research.htm)).

Quando o péptido ligando se liga ao recetor na extremidade N-terminal ativa a proteína G, que por sua vez produz mensageiros secundários como AMPc (Adenosina Monofostato cíclica), via adenilciclase ou IP3 (Inositol 1,4,5-Trifosfato), via fosfolipase C (Cardoso, 2005, Katritch et al., 2012) (**Figura 7**).



**Figura 7. Representação esquemática das vias de sinalização desencadeadas pela interação do GLP-1 e GIP com os seus receptores em células  $\beta$ -pancreáticas humanas e consequente liberação de insulina.** A interação do GIP e do GLP-1 com os seus receptores desencadeia os mecanismos de transdução de sinal intracelular através do aumento do AMPc que ativa a proteína cinase A (PKA) e o Epac2. A PKA bloqueia a atividade dos canais iônicos membranares e facilita a despolarização da membrana o que leva à entrada de íons cálcio pelos VDCC (*voltage-gated calcium channels*) e estimula a liberação de cálcio intracelular do retículo endoplasmático. O aumento de cálcio intracelular, estimula a transcrição da proinsulina e facilita a fusão dos grânulos de insulina com a membrana plasmática e consequentemente a sua liberação das células  $\beta$ -pancreáticas. A produção de ATP nas mitocôndrias é aumentada devido ao aumento do cálcio intracelular que por sua vez é uma consequência da ativação do recetor GLP1R (retirado de Yabe et al., 2011).

A superfamília GPCR tem 5 famílias principais: Glutamato, Rodopsina, Adesão, Secretinas e “Frizzled/tast2” e os receptores do *glucagon* e péptidos relacionados fazem parte da família das Secretinas, também designada de família 2 GPCRs (Siu et al., 2010). A família das Secretinas constitui uma das principais famílias de receptores de hormonas caracterizados em vertebrados. Os membros desta família são caracterizados pela presença, na sua estrutura, de um domínio N- terminal extracelular relativamente grande em relação aos outros receptores que contém seis cisteínas e vários motivos de glicosilação muito conservados e que têm um papel importante para a estabilização do recetor e na formação do *ligand-binding pocket* (Pal et al., 2012 e Kobilka, 2007).

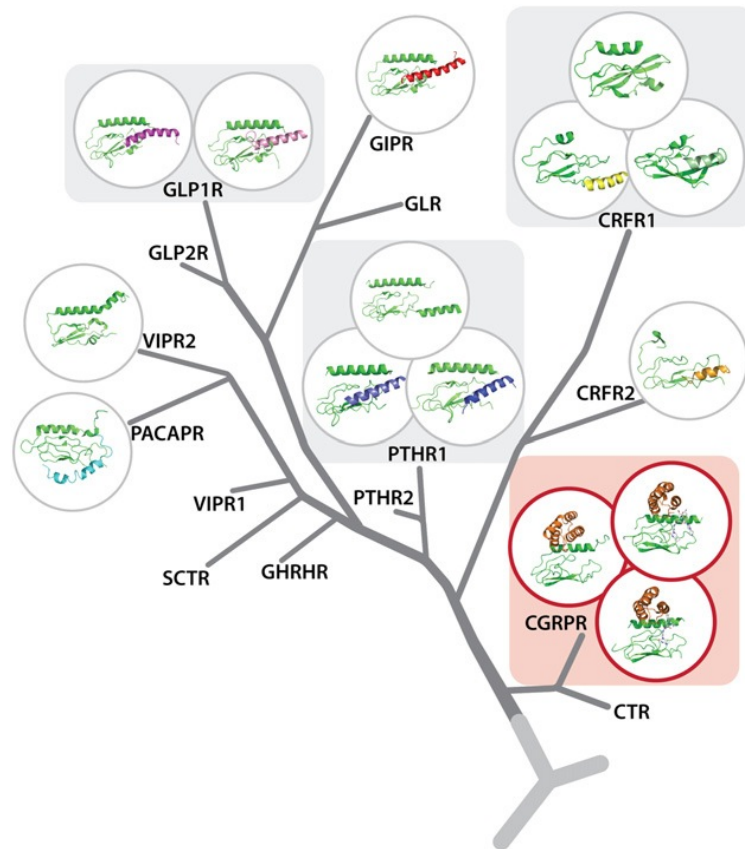
Em mamíferos quatro receptores específicos para cada péptido da subfamília do *glucagon* foram caracterizados e são o recetor do *glucagon* (GCGR), recetor do GLP-1 (GLP1R), recetor do GLP-2 (GLP2R) e o recetor do GIP (GIPR). Genes homólogos, em sequência e função, relativamente aos membros desta família em mamíferos, foram identificados em outros vertebrados tais como aves, anfíbios e peixes e, recentemente, o novo membro desta família o GCRPR ausente do genoma de mamíferos, foi identificado em outros vertebrados (Park et al., 2013). Estudos de cristalografia de raio X construíram um modelo que explica a ligação dos péptidos aos receptores e concluíram que a ligação GLP-1/GLP1R se efetua na região N-terminal extracelular do recetor e resíduos da região central da alfa helice (Moon et al., 2012, Baggio et al., 2007). Estudos *in vitro* sugerem que o primeiro loop extracelular e o domínio N-terminal do GIPR, são importantes para a afinidade com o seu ligando GIP e a consequente ativação (Yabe et al., 2011, Baggio et al., 2007).

De acordo com a sua similaridade em sequência e afinidade para os péptidos ligandos para além dos membros da subfamília *glucagon*, 4 outras subfamílias de receptores fazem parte da família das secretinas-GPCR e são: a subfamília dos receptores para PACAP ou PAC1 (recetor do *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*), recetor da secretina (SCTR), GHRHR (recetor do *Growth Hormone-Releasing Hormone*) e VIPR ou VPAC (recetor do *vasoactive Intestinal Polypeptide*); subfamília dos CRHR 1 e 2 (recetor do *Corticotrophin Releasing Hormone*); subfamília do CALCR (recetor da *calcitonin*) e CALCRL (recetor da *Calcitonin Related- Like Peptide*); e a subfamília da PTHR (recetor da *Parathyroid Hormone*) e PTHrPs (recetor da *PTH- related peptide*) (Siu et al., 2010) (**Figura 8**).

### **1.3.2 Distribuição e função dos receptores da família do *glucagon* em mamíferos**

O *glucagon*, exerce o seu efeito através da ligação ao recetor transmembranar GCGR. O recetor do GCG em humanos é constituído por 477 aminoácidos e tem maior expressão ao nível dos rins e fígado, mas também se pode encontrar no pâncreas, no cérebro, no baço, no trato gastrointestinal, no coração, nos adipócitos e na retina (Kim et al., 2008). As ações do recetor variam em função do tecido onde é expresso. No cérebro tem uma função neuroendócrina, no tecido adiposo favorece a lipólise e no coração acelera o ritmo cardíaco (Kim et al., 2008). Em mamíferos o GCGR é expresso nas células ilhéus  $\alpha$ , mas também nas células  $\beta$  do pâncreas estando envolvido no mecanismo de feedback bidirecional da regulação

da glicose (Habegger et al., 2010). A sinalização via GCGR também é crucial para permitir uma proliferação celular normal no pâncreas (Habegger et al., 2010).



**Figura 8. Relação filogenética entre os membros da família GCGR/GLPR/GIPR com os outros recetores da família 2 GPCRs ou família das secretinas.** A representação da interação tridimensional das diferentes regiões extracelulares (a verde) com os diferentes ligandos (cores diferentes) deduzidas por raios-X ou NMR estão ilustradas. Os membros da família CGCR/GLPR/GIPR são filogeneticamente mais relacionados com o grupo VIPR/PACAPR/GHRHR e ambas as subfamílias divergiram do mesmo ancestral comum após os PTHRs (retirado de Siu et al., 2010).

O GLP-1 interage com o GLP1R para exercer a sua ação. É um recetor com 463 aminoácidos no humano e encontra-se expresso ao nível das células  $\beta$  do pâncreas e a sua ação neste órgão estimula a libertação da insulina. No sistema nervoso central e periférico este recetor está envolvido em funções neuroprotectoras, na redução do apetite e na perda de peso. O GLP1R encontra-se também expresso nos rins, no pulmão e no coração mas a sua função nestes órgãos ainda não é bem conhecida. A sua função em outros vertebrados é relativamente conservada à exceção dos peixes que tem um efeito semelhante ao GCGR de mamíferos (Polakof et al., 2011). No humano o recetor para o GLP-2 é constituído por 551 aminoácidos, apresenta bastante homologia com o GLP1R, mas a sua expressão encontra-se essencialmente

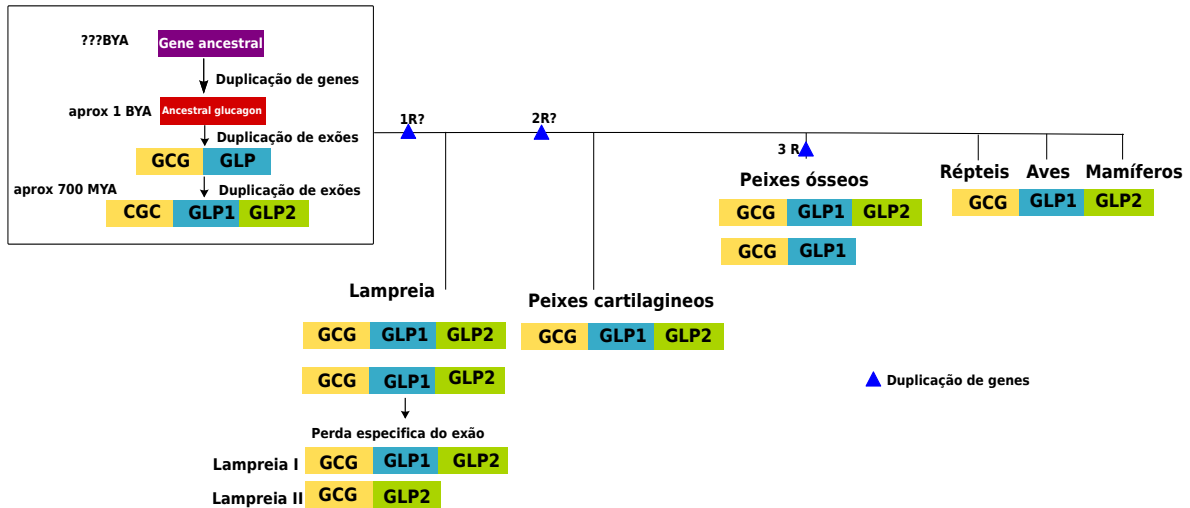
ao nível do intestino delgado, mas também nos pulmões e hipotálamo (Marathe et al., 2013). A sua função é relativamente pouco estudada em relação aos outros membros desta família, inclusive em mamíferos.

O recetor do GIP (GIPR) é constituído por 466 aminoácidos em humano. É essencialmente expresso nas células  $\beta$  do pâncreas onde estimula a secreção da insulina e inibe a secreção de ácido gástrico. É estruturalmente semelhante ao GLP1R o que pode explicar as funções semelhantes entre o GIP e GLP-1 na regulação da glucose (Yabe et al., 2011). Em mamíferos, o GIPR é maioritariamente expresso no pâncreas, no estômago e no tecido adiposo no entanto já foi detetado em outros tecidos tais como no coração, nos pulmões e no sistema nervoso central. No tecido adiposo o GIPR está envolvido na regulação do metabolismo dos lípidos mas em outros tecidos a sua função ainda não é conhecida (**Figura 6**) (Yabe et al., 2011, Baggio et al., 2007). A sua função em outros vertebrados é ainda pouco estudada.

#### **1.4 Evolução da família do *glucagon* e seus recetores**

Membros da família do *glucagon* e seus recetores já foram isolados e caracterizados em várias espécies de peixes e em outros vertebrados tais como anfíbios, aves e vários mamíferos incluindo o humano, e a sua presença e o seu papel conservado na regulação dos níveis de glucose no plasma sugerem que este sistema desempenha um papel fundamental na fisiologia (Irwin et al., 2011) (**Figura 9**).

Em peixes 5 recetores existem (GIPR, GLP1R, GLP2R, e dois GCGR) em comparação com 4 (GIPR, GLP1R, GLP2R, GCGR) em mamíferos e a presença de genes extra no genoma deve-se a eventos de duplicação específicos na linhagem dos peixes teleósteos (Irwin et al., 2005, Irwin et al., 2011) (**Figura 9**).



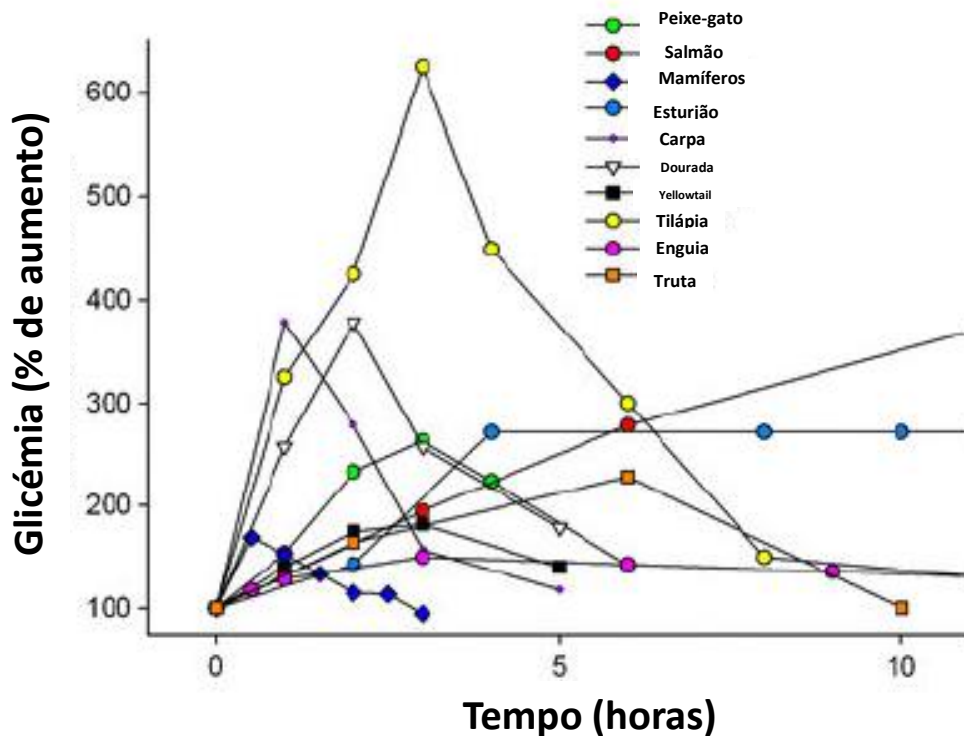
**Figura 9. Representação esquemática da evolução do precursor *proglucagon* em vertebrados.** O precursor do *proglucagon* está representado por um retângulo e as diferentes cores representam as regiões que codificam para os diferentes péptidos: *glucagon* GCG (amarelo), GLP-1 (azul) e GLP-2 (verde). 1R e 2R representam os eventos de duplicação do genoma que ocorreram durante a evolução dos vertebrados e 3R representa o evento de duplicação do genoma específica dos peixes teleósteos (adaptado de Ng et al., 2010).

Recentemente, no genoma de peixes, anfíbios e aves foi identificado um novo gene que codifica um novo recetor desta família específico para o *glucagon-related peptide* (GCRPR). Os estudos sobre a sua função são praticamente inexistentes mas a estudos de expressão revelaram a sua presença no cérebro de *Xenopus* (Irwin et al., 2011). Em humano este recetor ainda não foi isolado e tal como o seu péptido específico, parece que foram eliminados do genoma de mamíferos durante o processo evolutivo (Irwin et al., 2011, Park et al., 2013, Irwin, 2014). O GCRPR é filogeneticamente mais semelhante ao GIPR e recentemente foi sugerido que a sua presença ou ausência no genoma do peixe zebra e outros peixes em geral poderá estar relacionada com a ausência ou existência do sistema GIP/GIPR, respetivamente (Park et al., 2013).

## 1.5 O papel do *glucagon* e seus recetores na homeostasia da glicose em peixes

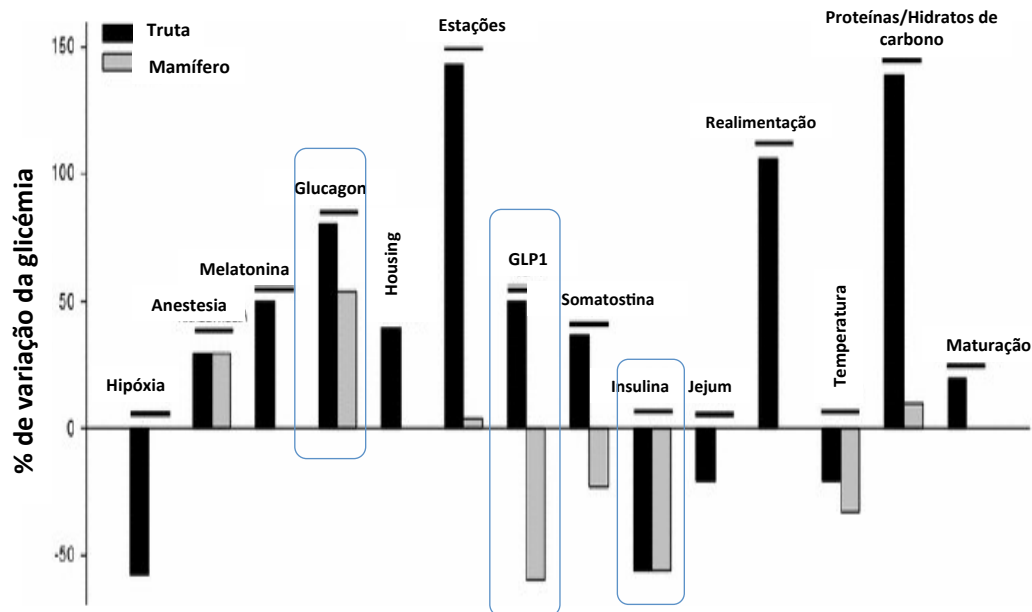
Os primeiros estudos de metabolismo da glicose em peixes datam de meados de 1800, com a descoberta dos corpos de *Brockmann* em teleósteos por *Stannius* e *Langerhans*. Phillips et al (1948) e Falkmer (1961) foram os primeiros a propor que os peixes eram resistentes a hiperglicémias e a ideia de que os peixes eram intolerantes à glicose e que não possuíam capacidade para regular os níveis de glicose no plasma persistiu durante muito tempo (Moon,

2001). No entanto, recentemente foi demonstrado que em peixes, tal como em mamíferos, existem mecanismos centrais e periféricos que controlam e contribuem para a regulação do metabolismo da glicose (Polakof et al., 2006, 2007, 2008). Os peixes teleósteos são o grupo de vertebrados bastante diverso com mais de 25 mil espécies identificadas e os níveis de glicose no plasma nas poucas espécies estudadas revelam que são uma característica de cada espécie (Polakof et al., 2012) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Variação da porcentagem de aumento da glicemia em mamíferos e em diferentes peixes quando sujeitos a um teste de tolerância à glicose oral ao longo do tempo (horas) (retirado de Polakof et al., 2012).

Vários estudos demonstram que em peixes, tal como em outros vertebrados, a insulina provoca um efeito de hipoglicemia. No entanto a resposta é mais lenta e níveis constantes de glicemia verificam-se mesmo após situações de jejum ou ingestão de alimentos (Polakof et al., 2011). Os peixes em geral apresentam elevada tolerância a hiperglicemias, (estudos em perca indiana (*Anabas testudineus*) indicam uma diminuição da hemoglobina glicosilada perante uma situação de hiperinsulinemia ou hiperglicemia) sem desenvolverem sintomas típicos da diabetes em mamíferos (Barma et al., 2006). Em peixes, a temperatura corporal (Connors et al., 1978), alterações ambientais (Soengas et al., 1992), fatores de stress (Conde-Sieira et al., 2010), mudanças na composição da dieta (Soengas et al., 2006), podem também influenciar o metabolismo da glicose (Polakof et al., 2012) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Variação da glicemia em mamíferos (rato, humano, coelho e gato) e em peixes (truta) submetidos a diferentes alterações fisiológicas, ambientais e farmacológicas. De notar o efeito contraditório do GLP-1 entre mamíferos e peixes enquanto que o *glucagon* e a *insulina* apresentam o mesmo padrão de resposta. O *glucagon* foi injetado em truta (10-100  $\mu\text{g/Kg}$ ) e no rato (200  $\mu\text{g/Kg}$ ); para o teste do GLP1 injetaram em truta (100  $\mu\text{g/Kg}$ ) e no humano (0.5 pmol/Kg/min), a *insulina* foi testada em truta e coelho e o jejum foi de 21 dias comparando a truta com o rato e a realimentação ocorreu 3 dias depois do jejum. Imagem retirada de Polakof et al., 2012.

A glicose estimula a secreção de *insulina* (produzida nos corpos de *Brockmann*) em muitas espécies de peixes contudo a secreção de *insulina* é induzida sempre após ingestão de alimentos independentemente de uma dieta com ou sem hidratos de carbono.

Evidências da existência em peixes de um sistema complexo envolvido na regulação da glicose foi demonstrado em situações de hiperglicémia, em que se verificam alterações da ingestão de comida e em situações de jejum em que se verificam alterações nos níveis de glicose e de glicogénio (Soengas e Aldegunde, 2004; Soengas et al., 2006). Perante situações de jejum verificam-se baixos níveis de *insulina* no plasma e aumenta o *glucagon* e os níveis de *glucagon* só diminuem após ingestão de alimentos hidratos de carbono (Polakof et al., 2012) (Figura 7). Estudos recentes mostram a possibilidade da existência de um eixo intestino-cérebro ancestral em alguns peixes teleosteos em que o peptídeo GLP-1 tal como o seu recetor (GLP1R) parecem estar envolvidos na ativação do sistema sensor de glicose e o GLP-1 tem uma ação hiperglicemiante semelhante ao do *glucagon* inibindo a ingestão de comida (Polakof et al., 2011a).

Em peixes, tal como em outros vertebrados estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que o *glucagon* e a insulina são também as principais hormonas reguladoras do metabolismo da glicose (Epple et al., 1987, Mommsen e Plisetskaya, 1991, Plisetskaya e Mommsen, 1996) (**Figura 11**). Experiências realizadas em truta revelaram que a insulina induz a glicólise, inibe a gliconeogénese, e aumenta a síntese de glicogénio no fígado, no músculo e no tecido adiposo (Polakof et al., 2012). O *glucagon* é libertado dos corpos de *Brockmann* e em truta após a ligação ao recetor ativa a via AMPc induzindo a nível hepático a glicogenólise e a gliconeogénese em respostas a situações de hipoglicémias (Puviani et al., 1990).

Em peixes, o GLP-1 foi isolado no trato gastrointestinal sendo o seu principal órgão de ação o fígado, podendo também ter um papel fisiológico no cérebro (Plisetskaya e Mommsen, 1996, Polakof et al., 2011a). O GLP1 em peixes tem uma função muito diferente do que se verifica nos mamíferos. Este péptido permite também a libertação de glicose dos hepatócitos (glicogenólise) e a gliconeogénese no entanto desconhece-se ainda de que forma uma alimentação rica em carboidratos afeta os níveis de GLP1 (Polakof et al., 2012) (**Figura 11**).

As funções do GLP-2 em peixes estão ainda pouco estudadas (Polakof et al., 2012) e as do GIP que em mamíferos tem propriedades insulínótropicas em peixes ainda se desconhece o efeito devido ao número restrito de espécies onde foi isolado. Sabe-se que este péptido é produzido no intestino, existe ao nível dos corpos de *Brockmann* e estudos em peixe zebra revelaram que ocorre um aumento da sua expressão após situações de jejum (Musson et al., 2009).

## 1.6 Contextualização do trabalho no âmbito da biotecnologia

Os problemas associados à desregulação do metabolismo da glicose e a prevalência de doenças associadas ao metabolismo da glicose em mamíferos estão normalmente associadas a causas endócrinas e muitos dos tratamentos passam por administração hormonal para repor os níveis homeostáticos de glicemia. A contextualização deste trabalho no âmbito da biotecnologia aplicada está associada ao seu potencial contributo na saúde humana e na melhoria da produção animal por vias biotecnológicas.

Na saúde humana um conhecimento mais profundo deste sistema em outros vertebrados irá permitir desenvolver novas abordagens no combate às doenças associadas ao metabolismo e regulação de glicose nomeadamente no desenvolvimento de novos fármacos tendo por base os péptidos funcionais homólogos em peixes e os seus recetores. A caracterização dos recetores para o *glucagon* e seus péptidos em peixes teleósteos vai permitir

conhecer melhor o papel deste sistema em vertebrados e possivelmente identificar e caracterizar novas moléculas e funções fisiológicas que foram eliminadas durante o processo evolutivo em mamíferos mas que permanecem em outros vertebrados e o seu isolamento poderá contribuir para identificar novas drogas que potencialmente poderão ser utilizadas em mamíferos. A diabetes é a doença endócrina mais frequente e deve-se a uma desregulação na produção de insulina. Muitos dos tratamentos aplicados a esta doença envolvem não só a administração de insulina como também de alguns destes péptidos tal como do GCG e GLP-1. Os péptidos humanos *glucagon* e GLP-1 recombinados (utilizando bactérias como sistemas hospedeiros) têm sido utilizados na medicina humana para regular o metabolismo da glicose. O *glucagon* é administrado em casos de hipoglicemia em doentes com diabetes tipo 1 e os agonistas do péptido GLP-1 funcionam como mimético da incretina e são utilizados nomeadamente em doentes com diabetes tipo 2 (Gallwitz, 2011).

No entanto este tipo de péptidos tem um tempo médio de vida curto e são de fácil degradação no organismo e a utilização de péptidos homólogos de peixes com funções idênticas poderá ser uma alternativa viável para aumentar o tempo de vida do *glucagon* e outros péptidos desta família em humanos e aumentar a sua eficácia.

Em produção animal e especificamente em aquacultura, o problema das fontes de proteína e lipídios para produção de rações tem levado a um aumento na utilização da material vegetal. Um melhor conhecimento sobre a fisiologia dos peixes nomeadamente na regulação de glicose e a tolerância à glicose é fundamental. O sistema endócrino é uma parte central na regulação de glicose e um melhor conhecimento sobre o papel do *glucagon* e seus recetores vai permitir aumentar o conhecimento sobre a utilização de glicose em peixes. Esta informação poderá ajudar a desenhar novas dietas adequadas e direcionadas para a otimização de crescimento e aumento de massa corporal, que representam os elementos chave na sustentabilidade económica da aquacultura.

## 2. Objetivos

O sistema endócrino do *glucagon* e seus recetores tem um papel crucial na regulação da glicose em mamíferos e a sua aplicação no tratamento de doenças associadas a desequilíbrios da glicose, tem sido cada vez mais utilizada. A existência de membros desta família com funções antagónicas na regulação da insulina em mamíferos, torna o seu estudo extremamente interessante e complexo. Em peixes apesar da existência de genes homólogos os mecanismo da regulação endócrina da glicose que envolvem membros desta família são muito pouco conhecidos e o seu estudo comparativo poderá contribuir para uma melhor compreensão da sua função e evolução na homeostasia da glicose em vertebrados, bem como elucidar sobre o seu potencial envolvimento em outros processos fisiológicos.

O objetivo principal deste trabalho consiste em identificar e caracterizar funcionalmente os membros da subfamília do *glucagon* e seus péptidos ligandos em peixes e determinar qual o seu papel na regulação da homeostasia da glicose. Este objetivo será alcançado através de:

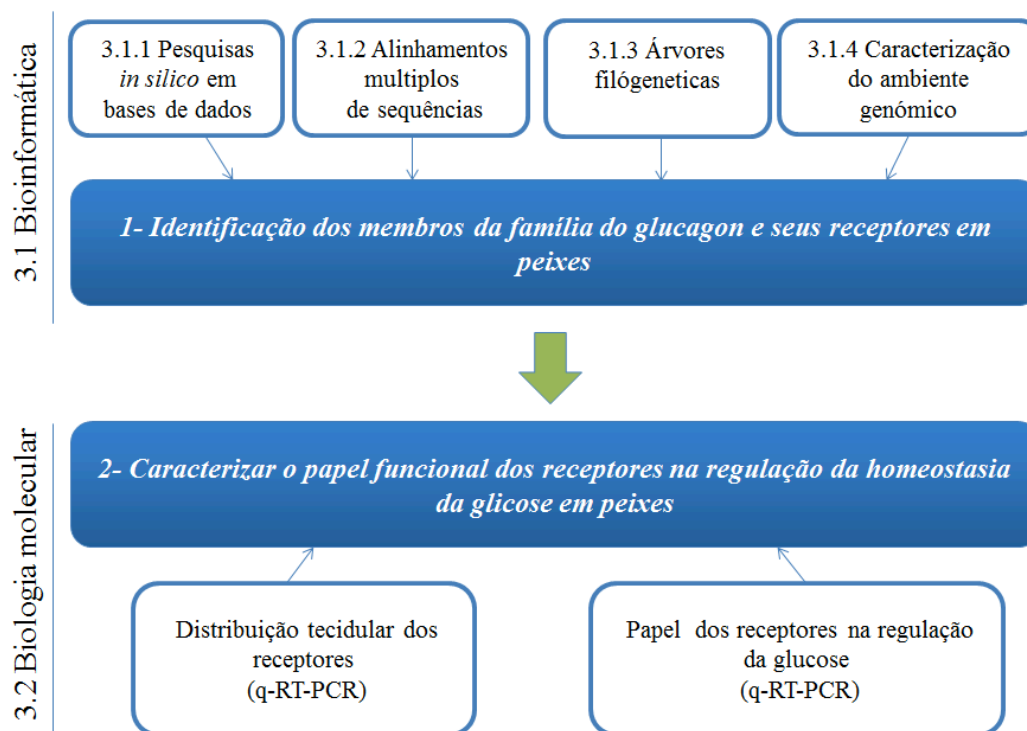
- a) Identificação *in silico*, estudo evolutivo e funcional dos recetores e péptidos da família do *glucagon* em peixes;
- b) Caracterização do seu potencial papel funcional e envolvimento na regulação da glicose em peixes.

### 3. Materiais e Métodos

O trabalho experimental desenvolvido encontra-se abaixo descrito e está organizado em duas secções (**Figura 12**):

3.1 Análise bioinformática com o objetivo de identificar os membros da família do *glucagon* e seus recetores em peixes;

3.2 Técnicas de biologia molecular com o objetivo de caracterizar o seu papel funcional na regulação da glicose em peixes.



**Figura 12.** Representação esquemática da metodologia seguida ao longo do decorrer do trabalho experimental.

#### 3.1. Análise bioinformática

##### 3.1.1 Pesquisas *in silico* em bases de dados

Como o objetivo de identificar e caracterizar a evolução dos membros da família dos recetores GCG/GIP e os seus péptidos ligados em peixes, os recetores e péptidos previamente isolados no peixe zebra e no humano foram utilizados para pesquisar genes

homólogos em diferentes bases de dados (genomas, ESTs e nucleótidos) existentes para vários peixes (**Tabela 1**).

**Tabela 1. Principais bases de dados consultadas, durante as pesquisas de bioinformática para recolha de sequências.**

	<i>Espécies</i>	<i>website</i>	<i>Acedido em</i>
<i>Peixes de barbatana lobada</i>	Celacanto	www.ensembl.org	Outubro, 2013
<i>Peixe de barbatana raiada</i>	Teleósteos	www.ensembl.org/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Outubro, 2013
	Outros teleósteos		
	Robalo	Sea bass genome assembly (privada)	Outubro 2013
	Salmão	http://salmondb.cmm.uchile.cl/blast/	Abril, 2014
	Enguia	http://www.zfgenomics.org/sub/eel	Abril, 2014
<i>Peixes cartilagineos</i>	Tubarão elefante	http://esharkgenome.imcb.a-star.edu.sg	Outubro, 2013
<i>Agnatha</i>	Lampreia	www.ensembl.org	Outubro, 2013

### 3.1.2 Pesquisas em bases de dados de genomas

Para a identificação do novo membro desta família, o recetor GCRPR, foi utilizada a sequência de Takifugu (*Takifugu rubripes*) (ENSTRUG00000015257) e para o novo peptídeo GCRP utilizou-se a sequência da galinha, *Gallus gallus* (JH375139.1) e *medaka* (*Oryzias latipes*) (scaffold 169) (Park et al., 2013; Irwin et Prentice, 2011). Os resultados obtidos foram selecionados de acordo com a sua maior similaridade para as sequências alvo e os que apresentavam valores estatístico esperado (*e-values*) mais baixo. Pretendeu-se consultar várias bases de dados de peixes evolutivamente distantes desde os peixes de barbatana lobada (*lobe finned fish*), passando pelos peixes de barbatana raiada (*ray finned fish*, onde estão incluídos os peixes teleósteos), peixes cartilagineos e as lampreias (representantes da ordem dos *Agnatha*, primeiro grupo de vertebrados a emergir).

As pesquisas também foram realizadas em genomas de vertebrados terrestres e em invertebrados. Os genomas de vertebrados incluíram o genoma do anfíbio *Xenopus tropicalis*, dos répteis o lagarto (*Anolis carolinensis*) e da tartaruga chinesa (*Pelodiscus sinensis*), da ave a galinha (*Gallus gallus*), e de mamíferos o humano (*Homo sapiens*) e o rato (*Mus musculus*) que também estão disponíveis no ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>). Os invertebrados pesquisados foram o dos representantes de cordados ancestrais, o ouriço-do-mar

(*Strongylocentrotus purpuratus*, (<http://metazoa.ensembl.org/>), o cefalocordado anfioxo (*Branchiostoma floridae*, <http://genome.jgi-psf.org/Brafl1/Brafl1.home.html>, acessada em abril, 2014) e do tunicado *Ciona intestinalis* (<http://www.ensembl.org>). As sequências de aminoácidos dos ligandos *proglucagon*, GIP e GCRP, também foram pesquisadas para as mesmas espécies referenciadas na pesquisa dos recetores e recorrendo às mesmas bases de dados respetivamente.

### 3.1.3 Pesquisas em bases de dados de ESTs

As pesquisas em bases de dados de ESTs (*Expressed Sequence Tags* – consideradas partes de sequências obtidas em projetos de sequenciação de clones de cDNA) em peixes, teve por principal objetivo a) identificar novos transcritos e complementar as pesquisas realizadas no genoma e b) identificar tecidos alvo onde os membros desta família se encontram expressos. Estas pesquisas foram efetuadas na base de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando como molde os genes homólogos identificados em Tilápia (*Oreochromis niloticus*) para os recetores e ligandos de interesse neste trabalho à exceção do GIP para o qual se recorreu ao peixe zebra *Danio rerio* (NP\_001073528.1). A Tilápia foi escolhida pois foram identificados no seu genoma todos os recetores e ligandos membros desta família.

Assim para a pesquisa dos EST's em peixes utilizou-se o algoritmo tblastn (que permite procurar na base de dados de nucleótidos utilizando sequências deduzidas de proteínas), e os resultados da pesquisa foram agrupados por espécie e apenas selecionamos os EST's que tinham um *e-value* inferior  $e^{-20}$ . As sequências foram retiradas e comparadas com as de tilápia para verificar a sua homologia e o local de origem (tecidos) onde os EST foram isolados foram anotados. A pesquisa para os ligandos foi efetuada de maneira idêntica utilizando a sequência do *proglucagon* 1 e 2 da tilápia e do GIP de peixe zebra (NP\_001073528.1).

### 3.1.4 Alinhamentos múltiplos de sequências

A análise comparativa das diferentes sequências retiradas foi realizada com o objetivo de identificar semelhanças/diferenças entre regiões potencialmente estruturais e funcionalmente importantes entre os diferentes membros da família com outros vertebrados. Para tal, alinhamentos múltiplos de sequências foram realizados utilizando o programa *Clustal W* (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>). O *software GeneDoc* foi utilizado para

editar os resultados dos alinhamentos e determinar percentagens de identidade e similaridade entre as várias sequências em estudo. Os domínios transmembranares dos recetores e regiões dos péptidos maduros foram identificados por comparação com as anotações já descritas no humano no *UniProt* (<http://www.uniprot.org>).

### 3.1.5 Análise filogenética

Para caracterizar a evolução dos recetores e péptidos ligandos árvores filogenéticas foram construídas com base em alinhamentos de sequências utilizando as sequências de aminoácidos deduzidas dos genes e transcritos identificados anteriormente. As árvores foram construídas utilizando a plataforma *Phylogeny.fr* (<http://www.phylogeny.fr/>) e o programa *Prot Test 2.4 server* ([http://darwin.uvigo.es/software/prottest2\\_server.html](http://darwin.uvigo.es/software/prottest2_server.html)) foi utilizado para escolher a matriz mais adequada para a análise evolutiva. As árvores filogenéticas para os recetores foram construídas utilizando as regiões mais conservadas entre os recetores desde a região transmembrar 1 (TM1) até à região transmembrar 7 (TM7) incluindo as regiões intra e extracelular entre os domínios TMs. Na análise incluímos um total de 98 recetores e a árvore foi construída usando dois métodos: o *maximum likelihood* (ML) e método de *neighbour-joining* e análise estatística dos ramos foi realizada utilizando 100 e 1000 replicados de *bootstrap*, respetivamente (Felsenstein, 1985). A sequência para PTH1R do humano (ENSP00000321999) foi utilizada para enraizar a árvore. O modelo escolhido para a construção da árvore de acordo com o modelo estatístico *Akaike Information Criterion* (AIC) (Abascal et al., 2005) foi o JTT + G + F (Jones et al., 1992) com 4 *gamma-distributed rate categories* e um valor de *gamma shape* fixo de 0.77. Para a análise filogenética dos ligandos utilizamos as sequências completas da proteína para precursor pro-GCG que inclui o GCG, GLP-1 e GLP-2 e do precursor GIP e o peptídeo maduro para o GCRP, que foram submetidas no programa *Prot Test 2.4 server* ([http://darwin.uvigo.es/software/prottest2\\_server.html](http://darwin.uvigo.es/software/prottest2_server.html)) e obtivemos como modelo mais adequado o JTT+I+G com um *gamma shape* fixo de 1.404 e uma proporção de locais invariáveis (*invariable sites*) fixo de 0.007. A árvore não foi enraizada.

### 3.1.6 Caracterização do ambiente genómico

O ambiente genómico dos recetores foi caracterizado com base na anotação dos genes vizinhos de acordo com o programa ENSEMBL. Esta análise foi realizada para a) caracterizar a evolução dos recetores do GIPR e GIP em peixes, e b) caracterizar a origem dos recetores GCGR/GIPR em deterostómios comparando o ambiente genómico de *Ciona* com a *spotted gar* e o humano.

A região do genoma na vizinhança do GIPR e GIP de peixe zebra foi utilizada como modelo para identificar regiões homologas de genes nos genomas de outros peixes evolutivamente distintos utilizando pesquisas de similaridade de sequências ou por anotação *in silico*. Genes que foram identificados conservados entre os diferentes peixes foram utilizados para pesquisar os genomas de tubarão elefante e da lampreia mas só regiões fragmentadas foram encontradas.

A comparação entre os genomas de *Ciona* e dos vertebrados foi feita utilizando o programa *BioMart* disponível no ENSEMBL. Uma região de cerca de 2 Mb acima e abaixo do *loci* dos dois recetores glucagon-like (ENSCIONG00000006557 e ENSCIONG00000006559) de *Ciona intestinalis* no cromossoma 2 foi selecionada e utilizada para identificar regiões homólogas no genoma de duas espécies representativas da evolução dos vertebrados: a *spotted gar* (peixe teleósteeo que não sofreu o processo de duplicação do genoma em peixes) e o humano que contém os recetores GCGR/GIPRs.

## 3.2 Amostragem e métodos experimentais de biologia molecular

### 3.2.1 Escolha das espécies e recolha de tecidos

Neste estudo utilizamos dois peixes teleósteeos com hábitos alimentares distintos, a tilápia (*Actinopterygii*, Perciformes, Cichlidae, *Oreochromis mossambicus*) um peixe herbívoro/omnívoro e o robalo (*Actinopterygii*, Perciformes, Moronidae, *Dicentrarchus labrax*) um peixe carnívoro, ambos obtidos dos stock de peixes mantidos pelo laboratório no PRODEP e do Ramalhete, respetivamente. Os peixes foram anestesiados em gelo e seguidamente sacrificados por decapitação e vários tecidos foram recolhidos e guardados a -80 °C até posterior utilização. A tilápia foi utilizada para isolar e caracterizar a distribuição tecidular dos recetores pois o genoma da tilápia (*Oreochromis niloticus*, espécie muito semelhante à experimental) já se encontra sequenciado e bem anotado, reproduz-se facilmente em cativeiro e existe em abundância no stock da universidade. De tilápia foram retirados os seguintes tecidos: gónadas, músculo branco, brânquias, coração, fígado, duodeno e cérebro.

O robalo foi utilizado para caracterizar o papel dos recetores da família do glucagon/GLP1/GIP no metabolismo da glucose pois ao contrário da tilápia, o nível de glucose em robalos é bastante variável, e é um peixe que apesar de utilizar na sua dieta poucos hidratos de carbono, numa situação de jejum o nível de glucose pode variar num curto espaço de tempo e em testes de tolerância à glucose a metabolização da glucose é relativamente rápida, ainda que seja mais lenta que em peixes herbívoros/omnívoros (Viegas et al., 2011 e Enes et al., 2011). Para esta experiência foram utilizados tecidos de robalo recolhidos de uma experiência anteriormente realizada por elementos do laboratório onde os peixes foram submetidos a um jejum até 48h e tecidos amostrados às 24h e 48h e onde estavam disponíveis dados sobre o doseamento da glicemia nos diferentes períodos de tempo. Devido ao facto de existir uma grande variabilidade entre os peixes do mesmo grupo e de não existirem valores de glicemia inicial (tempo zero da experiência) os peixes foram então divididos em dois grupos, um com os níveis mais baixo índice de glicemia (4.3 mmol/l) e outro com os níveis mais altos nível de glicemia (11.4 mmol/l) para comparação. Os tecidos escolhidos foram o cérebro, o fígado e o duodeno, uma vez que os recetores que provavelmente estão envolvidos na regulação da glucose GCGaR, GCGbR e GIPR têm maior expressão nestes tecidos. Dos animais experimentais foram recolhidos e anotados antes da dissecação dos tecidos, o peso e comprimento.

### **3.2.2 Métodos experimentais de biologia molecular**

#### **3.2.2.1 Extração do RNA**

O RNA total foi extraído de diferentes tecidos de tilápia e robalo para síntese de cDNA e análise da expressão quantitativa por q-PCR. O RNA foi extraído de acordo com dois métodos diferentes mas que se baseiam no mesmo princípio: o Total RNA Kit I (OMEGAbio-tek, VWR) foi utilizado para os tecidos de tilápia e o método de Extração de RNA total com o Maxwell 16 Total RNA Purification Kit (Promega) foi utilizado para os tecidos de robalo, de acordo com o protocolo do fabricante. Ambos têm por base quatro etapas, que correspondem à lise das células e tecidos, desnaturação dos complexos de nucleoproteínas, inativação ribonucleases endógenas e remoção de contaminantes (DNA e proteínas). Cerca de 30-50 mg de tecido foram recolhidos e seguidamente homogeneizados em solução de lise com  $\beta$ -mercaptoetanol (BME). Os tecidos foram completamente homogeneizados utilizando um processo de ruptura mecânica usando o *ultraturrax* (Maxwell 16 Total RNA Purification Kit) e no Total RNA Kit I, os tecidos foram macerados manualmente e repousaram durante 10

min à temperatura ambiente. Seguidamente foram centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm para separar restos de tecidos que ainda possam existir e obter um homogeneizado limpo. Para o Total RNA Kit I o sobrenadante foi retirado para um *eppendorf* limpo e foi adicionado igual volume de etanol 75% eluído com água DEPC. A mistura foi agitada com a pipeta (por vezes pode formar-se um precipitado de DNA), colocada na coluna de filtração e centrifugada durante 1 min na velocidade 13000 rpm à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e adicionou-se 500µl de solução de lavagem (*wash buffer I*) à coluna e centrifugou-se novamente 1 min 13000 rpm à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido novamente mas utilizando a solução de lavagem II (*wash buffer II*). Para retirar os restos de etanol, a coluna foi novamente centrifugada (2 minutos, 13000 rpm à temperatura ambiente) sem líquido e a coluna seca foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado 50µl de água DEPC para eluir o RNA. Para os extratos realizados com o Maxwell 16 Total RNA Purification Kit utilizaram-se *beeds* magnéticas MagneSil® PMPs para remover os contaminantes e a purificação do RNA foi feita automaticamente. O RNA obtido diluído em água DEPC foi quantificado por espectrofotometria ( $\lambda= 260$  nm) no Nanodrop 1000 obtendo um valor em ng/µl e foi separado em gel de agarose a 1% em TAE para verificar a sua integridade.

### 3.2.2.2 Tratamento do RNA

O RNA total extraído foi tratado com a enzima DNase para eliminar potencial contaminação com DNA genómico utilizando o kit DNA-free Kit (Ambion, UK) de acordo com o fabricante. Para concentrar as amostras o RNA foi precipitado adicionando 3 vezes o volume do RNA de etanol a 100% e 1/10 do volume do RNA de acetato de sódio. A mistura foi agitada e colocada durante a noite a precipitar -20°C. No dia seguinte o RNA foi lavado duas vezes com 500 µl de etanol a 75%, seco por evaporação e ressuspensionado no mínimo volume possível. Ao RNAtotal precipitado (até o máximo de 10 ug) foram adicionados 5µl de tampão, 1 µl de DNase (Turbo DNase™, Ambion, life thecnology, 2 U/ ul) e água para perfazer um volume final de 50 µl. A mistura reacional foi incubada durante 30 min a 37°C e seguidamente foram adicionados 5 µl de DNase inactivation reagente. As amostras foram agitadas por *vortex*, repousaram 2 minutos à temperatura ambiente e foram centrifugadas a 10000 rpm durante 1 minuto e meio e o sobrenadante (até ao máximo) foi retirado para um *eppendorf* novo.

### 3.2.2.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando 500 ng de RNA total até um volume máximo de 12.5 µl. De seguida foram adicionados 1 µl de *primers random hexamer* (GE Healthcare, UK), e desnaturou-se durante 5 min a 65 °C colocando-se em seguida em gelo. Ao RNA desnaturado adicionaram-se 4 µl de 5 x tampão de reação, 0.5 µl de Thermo Ribolock Rnases (Fermentas, 40 U/ µl), 2 µl de 10 mM de dNTPs e 1 µl de *Revertaid* reverse transcriptase (Fermentas, 200 U/µl) até um volume final de 20 µl. A síntese de cDNA foi efetuada colocando os tubos a 25°C durante 10 min, 42 °C durante 60 min e 70 °C durante 10 min no final guardou-se a -20 °C até utilização. Com o objetivo de determinar a qualidade e quantidade do cDNA sintetizado as amostras foram analisadas para a presença da unidade ribossomal 18S (gene de referência que é expresso em todos os tecidos) utilizando os *primers* descritos na **Tabela 2**, de acordo com a mistura reacional descrita na **Tabela 2** e de acordo com o ciclo (95 °C, 3 min; 95 °C 30 seg, 60 °C durante 30 seg, 72 °C, 30 seg repetidos 25 vezes; e 72 °C 5 min). O produto de PCR amplificado de tamanho esperado (aproximadamente 500 pb) foi observado em gel de 1 % agarose/1 x TAE.

### 3.2.2.4 Desenho de *primers*

Com o objetivo de caracterizar/quantificar a expressão dos recetores quer em tilápia quer em robalo, *primers* para os recetores de interesse foram desenhados tendo por base a sequência em nucleótidos dos 5 recetores (GCGRa, GCGRb, GLP2R, GIPR, GCRPR) de tilápia e 3 recetores (GCGRa, GCGRb e GIPR) de robalo. Os *primers* foram desenhados em locais específicos tendo por base regiões diferentes entre os recetores, com um tamanho entre 19 e 23 pb e uma temperatura de *melting* próxima ou superior a 60°C e cujo produto de amplificação tivesse entre 70 a 200 pb. Para verificar que os *primers* não formam dímeros ou *false priming* quando em reação as sequências escolhidas foram analisadas no programa *Primer Premier*. As sequências dos *primers* de cada recetor estão descritas na **Tabela 2**. Os *primers* foram sintetizados quimicamente (Sigma-Aldrich, UK) e diluídos em soluções stock a uma concentração de 100 µM.

### 3.2.2.5 PCR-Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Dois tipos de PCR foram utilizados neste trabalho o RT-PCR e o RT-PCR quantitativo (q-RT-PCR). RT-PCR foi utilizado para testar as condições iniciais de PCR com os *primers* e identificar tecidos alvo e depois da otimização do PCR o q-RT-PCR foi realizado para

quantificar a expressão em cada tecido por comparação com a abundância dos genes de referência. A técnica de PCR permite a amplificação de DNA de forma exponencial através de uma replicação de modo a facilitar a sua visualização, delimitando as regiões a amplificar com a utilização de *primers* específicos complementares com as sequências relevantes no estudo. A reação de PCR consiste fundamentalmente em três passos, a desnaturação por ação de temperaturas elevadas (93-98°C) que quebra as ligações do DNA e faz com que a cadeia esteja apta à ligação do *primer*, ligação ou *annealing* dos primers quando os *primers* encontram na cadeia de DNA a sua sequência homóloga ligam-se e delimitando a região a replicar (temperatura de ligação dependente de cada par de *primers*), e finalmente a extensão (normalmente a 72°C) onde se dá a polimerização da cadeia e se obtém a cópia completa da cadeia molde, estes passos constituem o ciclo que é repetido várias vezes, num termociclador.

Nas reações de amplificação dos fragmentos utilizou-se, uma mistura reativa constituída pela enzima *Taq* polimerase (Dream Taq DNA polimerase, 5 U/μl) – 0.06 μl, uma DNA polimerase termoestável, obtida a partir de uma bactéria termofílica (*Thermus aquaticus*) que resiste às oscilações da temperatura durante o ciclo, um tampão específico para a enzima (*Dream Taq Buffer*) (10x) – 1.5 μl, uma mistura de nucleótidos (A, adenina, C- citosina, G- guanina e T- Timina) dNTPs (10mM) - 0.3 μl/reação, os *primers* específicos *Forward* (10 μM) - 0.3 μl/reação e *Reverse* (10 μM) - 0.3 μl/reação, a água MiliQ (11.54 μl/reação) e o cDNA (1 μl/reação) , com um volume final da mistura de 15 μl. De seguida esta mistura reativa foi colocada num termociclador da BioRad de acordo com o ciclo: 95 °C durante 3 min; seguida de uma fase cíclica de 95 °C, 30 seg, X °C 30 seg (X para cada par de *primers*) e 72 °C 30 seg; e uma extensão final de 5 min a 72 °C para que se complete a etapa de extensão onde a enzima *Taq* tem um papel fundamental pois permite a alongação de todas as moléculas amplificadas. Foram testadas várias temperaturas para cada par de *primers* e a temperatura ideal está descrita na **Tabela 2**.

As reações de q-RT-PCR foram realizadas em duplicado (<5 % variação entre replicados) no equipamento o StepOne Plus Real-Time PCR Detection System (Applied Biosystems, Portugal) em microplacas de 96 poços (Bio-Rad, Portugal). O volume final utilizado na reação foi 10 μl e esta continha 5 μl SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad, Portugal), 300 nM do *primer forward(Fwd)* e *reverse(Rev)* (0.2 μl *primer Rev* + 0.2 μl *primer Fwd*). Para a tilápia foram utilizados 2 μl do cDNA template (amostras diluídas 1:5) com exceção para o gene GCRPR e 18S em que as amostras foram diluídas 1:10 ou 2 μl do

controle (água). Para o robalo foram utilizados 2 µl do cDNA template (amostras diluídas 1:5), para todos os genes exceto o gene 18S para o qual as amostras foram diluídas 1:800.

As condições de otimização do ciclo foram: 95 °C durante 30 seg, seguido por 45 ciclos a 95 °C durante 5 seg e a respectiva temperatura de *annealing* para cada um dos genes (**Tabela 2**) durante 10 seg. A curva padrão foi construída utilizando diluições seriadas de DNA plasmídeo contendo os genes de interesse e foi a partir destas que foram determinadas a eficiência e o  $r^2$  (coeficiente de determinação) das diferentes reações de PCR. Foram realizadas curvas de *melting* para detetar situações de *primer dimer* e reações de controle negativo, para excluirmos possíveis contaminações. Foi utilizado o gene ribossomal 18S para normalizar os valores obtidos. Para a tilápia foram utilizados 3 indivíduos e para o robalo 6 indivíduos, 3 de cada condição experimental, e ainda cada uma das amostras foi testada em duplicado.

**Tabela 2. Lista de primers utilizados nas reações de PCR.**

As temperaturas utilizadas e os parâmetros obtidos do q-RT-PCR estão indicados.

Gene	Primers	T ( °C)	Eficiência (%)	R <sup>2</sup> (Coeficiente de determinação)
<b>PCR</b>				
18S	Fwd- TCAAGAACGAAAGTCGGAGG Rev- GGACATCTAAGGCATCACA	60	-	-
M13	Fwd- GTAAAACGACGGCCAGT Rev- AACAGCTATGACCATG	60	-	-
<b>q-RT-PCR</b>				
<i>Tilápia</i>				
GCRPR	Fwd1-GACTGATGTGAGTGAGATGCT Rev1- GCTGTCAATGAAGACTGAAGC	58	107,6	0,992
GIPR	Fwd1- ACAGACAACAGGGACGTCTTT Rev1- GTGGTTTTTCAGAGAAAGCCAT	64	123	0,988
GCGbR	Fwd1-AACTCTCTTGAGCTTGTGAAG Rev1- ACATTTACAGTGGTTCCTGGA	60	107,9	0,993
GLP2R	Fwd2-TGTAGACGGAAGCAGTCGCTA Rev2-CCTGACCTTGAAGTGGTTGGT	60	106	0,995
GCGaR	Fwd1- TGTTCCCTGCAAAAGCTGAC Rev1 - GCACAACAACAGTAGTGTTAGG	62	112,9	0,995
18S	Fwd-TGACGGAAGGGCACCACCAG Rev- AATCGCTCCACCAACTAAGAACGC	60	98	0,994
<i>Robalo</i>				
GCGaR	Fwd-ACGGTTAGCTGTGCGATCG Rev-ACCAGGAGGTTGTGGAGGTAGA	60	109	0,97
GCGbR	Fwd-GCAACGGGACAGGGAAAGG Rev-CCAGCGGGTATGTGCGACA	60	96,2	0,98
GIPR	Fwd-GCAGCAACACGCGACAGG Rev-GAGCGGCAGACAGGGACA	62	97,5	0,98
18S	Fwd-TGACGGAAGGGCACCACCAG Rev- AATCGCTCCACCAACTAAGAACGC	60	100,2	0,99

### 3.2.2.6 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese é uma técnica que permite separar DNA ou RNA no gel em função da sua massa e tamanho molecular, pois é aplicado no gel um campo elétrico que em função das cargas das partículas permite que estas se movam sob influência de forças eletrostáticas para o eletrodo de carga oposta. Tanto o DNA como o RNA apresentam carga negativa e migram no sentido do polo positivo. Neste estudo as amostras foram separadas em gel de agarose, uma vez que este apresenta elevada capacidade de separação. A agarose, um polissacarídeo extraído de uma alga marinha, que se encontra em pó, é dissolvido num tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) que necessita de ferver para que ocorra a dissolução completa e homogênea, posteriormente é ligeiramente arrefecido e adiciona-se o brometo de etídeo, corante que se intercala entre os pares de bases da molécula de DNA e RNA e que quando exposto a luz ultra violeta ( $\lambda = 300\text{nm}$ ) apresenta fluorescência. Este gel de agarose é colocado num suporte e arrefece à temperatura ambiente até obter uma consistência rígida. Em função do tamanho das bandas que se pretendiam obter assim a concentração de agarose de 2% gel foi selecionada para melhor visualização de produtos PCR inferiores a 1kb. Antes de se colocarem as amostras nos poços do gel, foi lhes adicionada uma solução tampão saturada de sacarose designada de *loading buffer* que lhe confere densidade e um corante azul de bromofenol que favorece a visualização da amostra durante o carregamento no gel. Para se conseguir determinar o tamanho aproximado das bandas adicionamos no gel um poço que contém um marcador de peso molecular (1 KB *Ladder*). As eletroforeses decorreram durante aproximadamente 20 minutos a 120 v, o gel é submerso num Tampão 1 x TAE constituído por iões que permitem a passagem da corrente e mantém o pH constante. Os géis após eletroforese foram visualizados recorrendo a num transiluminador por luz ultravioleta.

### 3.2.2.7 Extração e purificação do DNA de uma banda de um gel de agarose

Utilizou-se o Kit Illustra™, GFX™ PCR DNA and gel Band Purification Kit (GE Healthcare) para extrair e purificar produtos de PCR de acordo com as instruções do fabricante. Cortaram-se os pedaços de gel correspondentes às bandas e colocou-se cada um num *ependorf*. Adicionou-se 10 $\mu\text{l}$  de tampão de captura (*capture buffer type 3*) por 10 mg de gel até ao máximo de 300  $\mu\text{l}$  e a agarose foi a derreter a 60 °C com agitação constante durante 30 min. A agarose derretida em *capture buffer* foi transferida para uma coluna GFX Microspin que vai reter o DNA por ligação a uma matriz de fibra de vidro. A mistura foi a incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente e foi centrifugada a uma velocidade de

13 000 rpm durante um minuto. O eluado foi descartado e a coluna lavada com 500 µl de *wash buffer type 1* e novamente centrifugada 1 minuto à uma velocidade de 13 000 rpm e este processo foi repetido novamente com 200 µl de *wash buffer type 1* para assegurar que as proteínas e os sais contaminantes sejam retirados. Finalmente colocou-se a coluna que contém o DNA num *epENDORF novo* e adicionou-se 20 µl de água MiliQ e incubou-se durante 5 min à temperatura ambiente, seguiu-se uma centrifugação de 2 min à velocidade 13 000 rpm para recuperar o DNA em água. Os produtos de PCR obtidos foram para sequenciar (determinar sequência em nucleótidos) para confirmar a sua identidade.

### 3.2.2.8 Reação de ligação

A ligação dos produtos PCR a um vetor pGEM® - T Easy vetor, (Promega) (vetor de clonagem) realizou-se na presença de uma enzima T4 DNA ligase que catalisa ligações fosfodiester entre os extremos 3' -OH e 5'-P do DNA, necessitando de ATP e Mg<sup>2+</sup> como cofactores, através de ligações covalentes. Os componentes que participam na reação são Ligase Buffer T4 ligase (10 x) - 1 µl, Vetor pGEM® - 0,3 µl, T4 DNA ligase - 0.75 µl, o produto de extração de banda - 4 µl, água miliq até prefazer o volume final de 10 µl . A reação foi a incubar a 4°C durante a noite.

### 3.2.2.9 Transformação bacteriana e seleção de clones transformados

A transformação de células competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) consiste na transferência do produto de DNA exógeno para uma bactéria. Considerando que as bactérias têm a capacidade de se multiplicarem de forma exponencial vamos no final obter inúmeras cópias do plasmídeo e consequentemente do nosso gene de interesse. A células bacterianas *E.coli* (100 µl) previamente preparadas no laboratório e guardadas a -80 °C, foi adicionado 10 µl de DNA da ligação e foram a incubar durante 30 min em gelo. Seguidamente procedeu-se a um choque térmico a 42 °C durante 2 min, colocando-se novamente em gelo durante 5 min (Sambrook et al., 1989). Simultaneamente colocou-se uma placa com meio LB agar + ampicilina (50 mg/ml) IPTG (0,5 M) e X-gal (80 mg/ml) na estufa a 37 °C para secar onde as bactérias foram semeadas em condições assépticas. As placas foram colocadas a 37°C e o crescimento ocorreu durante a noite. O vetor pGEM- T *easy* possui um gene de resistência à ampicilina que permite que só as bactérias resistentes a este fármaco cresçam. A cor branca das colónias positivas é devida ao facto deste vetor apresentar no *Multiple Cloning Site* (MCS) um segmento do gene lac-Z para a β-galactosidase de *E.coli* e sempre que ocorre a

inserção do DNA neste local a síntese de 3-galactosidase é inibida. Quando não há inserção do fragmento no MCS a enzima  $\beta$ -galactosidase é sintetizada e esta degrada o substrato X-gal (adicionado às placas) adquirindo as colónias uma cor azul, facilitando assim a sua identificação. As colónias positivas foram selecionadas nas placas e colocadas a crescer em meio LB + ampicilina líquido para favorecer o seu crescimento e para a extração do DNA plasmídico. As culturas líquidas de bactérias foram realizadas com agitação a 37 °C durante a noite. Para a identificação rápida de clones positivos o “*colony PCR*” foi realizado em que as bactérias “possivelmente” positivas cresceram durante 2 horas a 37 °C em 70  $\mu$ l de líquido e 2  $\mu$ l da cultura bacteriana foi utilizada diretamente na reação de PCR utilizando os primers M13F e M13R de acordo com o ciclo: 95 °C, 10 min (para garantir o rebentamento das bactérias por quebra da parede celular); 95 °C 30 seg, 60 °C durante 30 seg, 72 °C, 30 seg repetidos 35 vezes; e 72 °C 5 min). Os resultados foram observados em gel de agarose (gel 2% DNA) de acordo com o descrito anteriormente.

### 3.2.2.10 Extração de DNA plasmídeo

Este procedimento tem por base o método de lise alcalina de acordo com Sambrook et al., 1989. Cerca de de 2 ml da cultura bacteriana em meio líquido LB + ampicilina foi transferida para um *ependorf*, e o pellet celular obtido por centrifugação durante 2 min à velocidade 13000 rpm à temperatura ambiente. O *pellet* celular foi ressuscitado em 100  $\mu$ l de solução P1 (50 mM glicose, 25 mM Tris- HCl, 10 mM EDTA, pH8, com RNase A) com o auxílio do *vortex*, e a suspensão celular foi a incubar durante 10 min à temperatura ambiente. De seguida adicionou-se 100  $\mu$ l de P2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) (lise), misturou-se por inversão e colocou-se em gelo durante 5 min. Ao lisado foi adicionado 100  $\mu$ l de P3 (3 M KAc (acetato de potássio) precipita o DNA). Misturou-se novamente por inversão e incubou 10 minutos no gelo. Centrifugou-se 10 minutos à velocidade de 13000 rpm e o sobrenadante foi retirado para um *ependorf* novo, onde se adicionou 600  $\mu$ l (equivalente a dois volumes do líquido inicial) de Etanol 100%, frio para que ocorra a precipitação do DNA. Misturou-se por inversão e centrifugou-se durante 10 minutos à velocidade de 13000 rpm para sedimentar o DNA e descartar o sobrenadante. O pellet de DNA foi lavado duas vezes com 300  $\mu$ l de 70 % etanol com centrifugações de 5 min à temperatura ambiente. *Pellet* foi seco ao ar e o DNA ressuscitado em 40  $\mu$ l de água MiliQ. O DNA plasmídeo isolado foi quantificado no Nanodrop 1000 e depois utilizado para a construção das curvas de q-RT-PCR.

### 3.3 Quantificação de glicose no plasma

Na determinação da glicemia foram utilizadas amostras de plasma de robalo (*Dicentrarchus labrax*) obtido por centrifugação, e foi utilizado o Kit Glucose Assay for microplates (plasma and urine, Spinreact) o qual tem por base um método enzimático, que permite construir uma curva padrão para inferir o valor da concentração de glicose de cada amostra. Estes ensaios foram realizados por uma colega do laboratório e as amostras utilizadas pertencem a um projeto que está a decorrer no laboratório.

### 3.4 Análise estatística

Os dados do q-RT PCR, tanto de tilápia como de robalo, foram obtidos no programa do equipamento StepOne Plus Real-Time PCR Detection System (Applied Biosystems, Portugal). Para o estudo da expressão dos diferentes recetores em tilápia não foi possível realizar análise estatística devido ao fato de não existir número suficiente de amostras. As diferenças estatísticas entre as concentrações de glicose no plasma e entre a distribuição dos recetores em tecidos do grupo de robalos com baixos e elevados níveis de glicose foram realizados inicialmente testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov test) e os dados apresentavam uma distribuição normal e para isso recorreu-se ao teste t student para amostras independentes (*unpaired t test*) *bilateral (two-tail)* para comparar os dois grupos a partir da hipótese nula (não existem diferenças entre os dois grupos), com um intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Prism Graphpad software (versão 5)*.

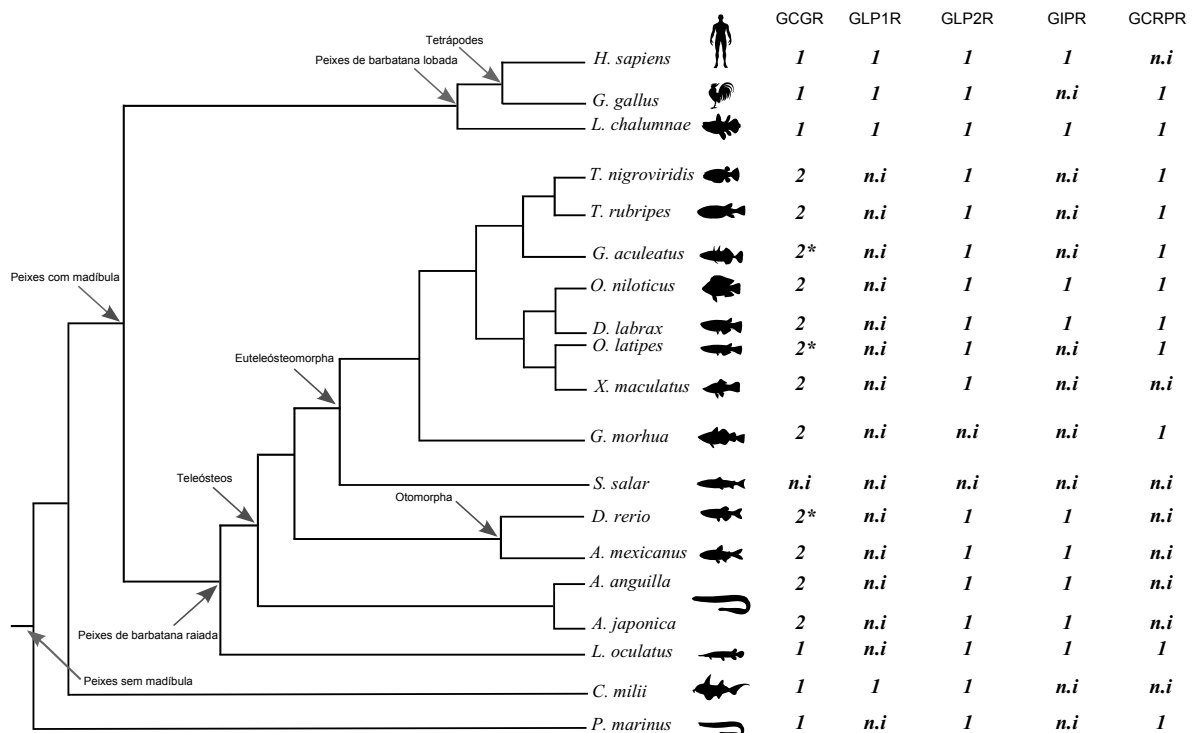
## 4. Resultados

### 4.1 Identificação dos diferentes recetores da subfamília do *glucagon* em peixes

Os membros da subfamília do *glucagon* foram identificados com base em pesquisas no genoma de vários peixes evolutivamente distintos incluindo representantes da class *Agnatha*, a lampreia marinha (*Petromyzus marinus*); o peixe cartilágneo tubarão elefante (*Callorhynchus millii*); vários peixes teleósteos e no genoma do celacanto (*Latimeria chalumnae*) o representante mais próximo dos tetrápodes) e em ESTs de teleósteos (Teleostei, taxid:32443) com a sequência de proteína para os recetores homólogos de humano e de peixe zebra (**tabela anexo 1**). O genoma da enguia (peixe teleósteo que divergiu logo a seguir ao processo de duplicação do genoma dos peixes) e o genoma do robalo (Percomorpha e modelo de estudo no laboratório) foram também pesquisados. A análise de ESTs teve como principal objetivo a verificação das sequências de genes previstos em peixes e também de determinar quais os tecidos onde este tipo de recetores são mais abundantes para facilitar os estudos de expressão tecidual.

Pesquisas de similaridade de sequências quer em bases de dados de DNA genómico como em ESTs (Transcriptoma) identificaram membros desta família desde o genoma de peixes mais ancestrais tal como o da lampreia até ao genoma do celacanto sugerindo que os membros da subfamília do *glucagon* emergiram cedo na evolução dos vertebrados (**tabela anexo 2, Figura 13**). Em lampreia e peixe cartilágneo 3 recetores foram encontrados e no genoma de peixes teleósteos o número de genes varia entre 4 na *spotted gar* e nos representantes da linhagem dos *Otomorpha* (o peixe zebra e o peixe das cavernas) bem como no genoma das duas enguias, no entanto nos genomas e ESTs dos peixes Euteleostomorpha em algumas espécies (tilápia, robalo e *Maylandia zebra*) parece existir mais um membro desta família. No celacanto, um total de cinco recetores foram identificados. Para contextualizar a evolução dos membros desta subfamília em vertebrados pesquisas de similaridade de sequências foram também realizadas em genomas de alguns tetrápodes, e em mamíferos verificou-se a existência de 4 recetores tal como na galinha. O réptil (*Anolis carolinensis*) e o anfíbio *Xenopus* (*Xenopus tropicalis*) têm o mesmo número de genes que o celacanto e estes correspondem aos cinco membros desta família (**Figura 13**). Em peixes teleósteos o número de membros desta família é variável (3-5) e as diferenças observadas correspondem à

presença e/ou ausência do GIPR e GCRPR nos genomas de alguns peixes. Nos genomas de tilápia, robalo e *Maylandia zebra* foi encontrado o gene correspondente ao homólogo do GIPR de humano que não foi identificado nos outros genomas consultados. Mais ainda o novo membro desta família o GCRPR não foi encontrado nos genomas de peixes Otomorpha o que sugere que este recetor tenha sido apagado no decorrer da evolução nesta linhagem de peixes após a separação dos Euteleosteomorpha (maior grupo de peixes teleósteos com genomas disponíveis).



**Figura 13. Número de membros da subfamília dos recetores *glucagon* identificados nos genomas de vários peixes.** A relação filogenética entre as linhagens de peixes encontra-se representada. Os “\*” representam genes cuja sequência foi confirmada pela existência de ESTs. *n.i.* indica “não identificado” pelas pesquisas realizadas.

Genes homólogos para o GCGR e GLP2R foram identificados em todos os genomas de peixes mas o GLP1R parece estar ausente. Duplicados para o GCGR existem em todos os peixes à exceção da *sptotted gar* e celacanto. Os genomas dos invertebrados o tunicado *Ciona intestinalis* e o cefalocordado *Branchiostoma floridae* também foram pesquisados para melhor compreender como evoluiu esta família de recetores e 2 genes putativos foram encontrados.

Os recetores para os quais foram identificados ESTs nas bases de dados e que confirmam a previsão de genes foram: para o GCGR em *medaka* (*Oryzias latipes*, 7), peixe

zebra (*Danio rerio*, 2), Esgana-gata (*Gasterosteus aculeatus*, 2) e também para a carpa (*Cyprinus carpio*, 1), peixe gato (*Ictalurus furcatus*, 3) e na marlonga negra (*Dissostichus mawsoni*, 2) que foram isolados em bibliotecas de transcritos de rim, fígado, e de fase embrionária. Para o GLP1R, verificou-se a existência de ESTs no peixe gato (1) e na carpa (1) em rim, músculo, cérebro, intestino e gónadas. Para o GLP2R, foram encontrados ESTs no cérebro, intestino, fígado e testículos do peixinho de cabeça-gorda (*Pimephales promelas*, 3), de carpa da erva (*Ctenopharyngodon idella*, 1), e de *Haplochromis burtoni* (1) e para o GIPR um único EST foi encontrado em Eperlano-arco-íris (*Osmerus mordax*, 1) obtido de cDNA de vários tecidos. **(Tabela anexo 2)**

#### 4.1.2 Análise filogenética

Para melhor confirmar a identidade dos recetores encontrados nas diferentes espécies, todas as sequências foram submetidas a uma análise filogenética tendo por base um alinhamento múltiplo de sequências com a proteína deduzida de cada gene (**Figura 14**). Árvores filogenéticas foram construídas com diferentes métodos utilizando um alinhamento múltiplo de sequências nos quais as regiões TM foram identificadas com base em anotações para recetores já descritas e a região *core* da TM1 até à TM7 foi utilizada. Para ter uma melhor perceção da evolução as árvores foram enraizadas utilizando como *outgroup* a sequência para o PTHR1 do humano. Como resultado das pesquisas em bases de dados das diferentes sequências dos recetores em mamíferos, aves, répteis, anfíbios, celacanto, peixes teleósteos e cartilagíneos, agnatas, tunicatos e cefalocordados, e da árvore filogenética constata-se a presença de 5 grupos ou *clusters* de recetores distintos nos quais agrupam os recetores homólogos do GLP2R, GCGR, GIPR, GLP1R presentes em todos os mamíferos e o novo grupo do GCRPR recentemente identificado em vários vertebrados (**Figura 14**). Estes cinco grupos bem diferenciados parecem ter uma origem comum e o agrupamento basal das sequências de anfioxo e *Ciona*, apresentam *clusters* que quando comparados com os *clusters* de recetores identificados em vertebrados indicam que estes estão na origem da sua diversidade. De acordo com o agrupamento dos ramos para os diferentes *clusters* de recetores, o GIPR e GCGR são os mais próximos evolutivamente e o GLP2R parecer ser o grupo de recetores que divergiu primeiro no decorrer da evolução dos vertebrados (**Figura 14**).

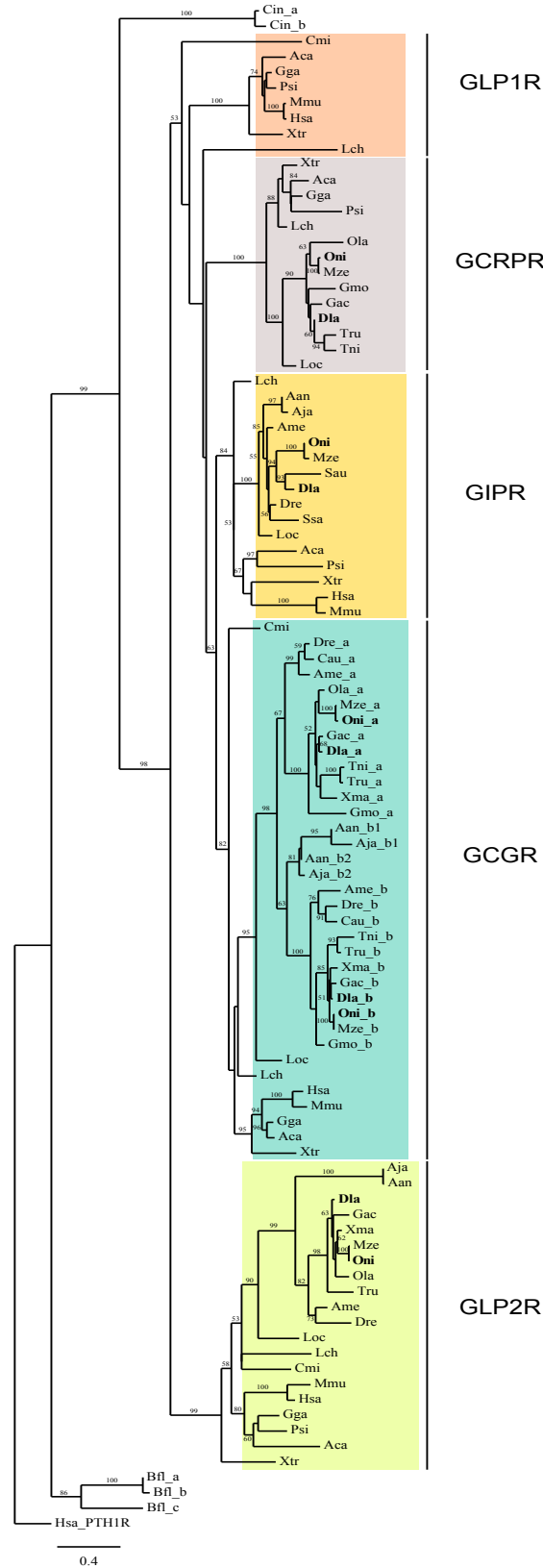


Figura 14. Árvore filogenética obtida com o método de *maximum likelihood* dos diferentes recetores da subfamília do *glucagon*, de peixes outros vertebrados e homólogos em *Ciona* (Cin) e aneurolepis (Bfl). A árvore filogenética foi construída utilizando um alinhamento de sequências de proteínas (TM1 até à TM7) dos recetores desta família de acordo com o modelo JTT+G+F e análise estatística de *bootstrap* de 100 réplicas. A árvore

foi enraizada com a sequência do humano para o recetor da PTH1R. Nome completo das espécies utilizadas na árvore estão indicadas na **Tabela anexo 1**.

Recetores homólogos para o GCGR e para o GLP2R de humano e peixe zebra foram identificados nos genomas de todas as espécies de vertebrados consultadas e, enquanto que o GLP2R existe sob forma de um único gene, o gene para GCGR em peixes apresenta duas cópias que se identificaram de GCGRa a e GCGRb, o que é coerente com os eventos de duplicação que se verificaram nos genomas dos peixes nas linhagens mais ancestrais. No entanto, no humano, no tubarão elefante (peixe cartilágneo), no celacanto e na Lampreia (peixe primitivo) apenas um gene para esta família foi identificado. Em enguia dois recetores GCGR também foram identificados mas não agrupam com os recetores homólogos nos outros peixes, e o seu agrupamento na árvore sugere que a existência de genes duplicados no seu genoma é o resultado de uma duplicação específica na linhagem das enguias (**Figura 14**). Em peixes teleósteos recetores homólogos para o GLP1R não foram identificados mas a presença deste recetor foi identificada nos genomas de outros peixes tal como no celacanto e no tubarão elefante. Relativamente ao *cluster* do GIPR, também este existe sob a forma de uma única cópia e não está presente nas aves (galinha), encontrando-se somente em alguns peixes teleósteos, em mamíferos e no celacanto, nenhum gene homólogo foi identificado em peixes cartilágneos ou na lampreia. O *cluster* do GCRPR possui uma única cópia do gene e foi identificado em teleósteos e tetrápodes à exceção do humano.

### 4.1.3 Análise comparativa de sequências de recetores em peixes

As sequências de recetores identificadas neste trabalho em peixes, foram comparadas com os recetores homólogos de outros vertebrados com base na sua identidade/similaridade e na identificação de motivos estruturais e funcionais conservados.

#### 4.1.3.1. Similaridade e identidade

As percentagens de similaridade entre os peixes e outros vertebrados foram calculadas utilizando a tilápia como representante dos peixes teleósteos pois esta espécie possui os cinco tipos de recetores diferentes (**Tabela 3**). Quando se compara as diferentes sequências dos recetores de tilápia, os recetores GCGRa e GCGRb revelam ser os mais similares (68 % de similaridade e 54 % de identidade em aa). E os que se apresentam mais diferentes são o GLP2R e GCRPR, com as percentagens de identidade a variarem entre 29% e 54% e as percentagens de similaridade 43% e 68% em sequências de aa. Da comparação de sequências

dos recetores de tilápia com os recetores homólogos do robalo, takifugu e peixe zebra verificou-se que as percentagens de identidade e similaridade são bastantes elevadas. O robalo, de entre os peixes analisados nos quais foram identificados 5 recetores, é o que partilha maior identidade com a tilápia variando entre 70% em aa para os GIPRs e 88% em aa entre os GCGRb. O peixe zebra é o mais divergente e as percentagens de identidade variam entre 57% em aa entre os GLP2Rs e 64% em aa entre os GCGRb (**Tabela 3**).

**Tabela 3. Percentagem de identidade/similaridade entres os recetores da família do GCGR/GLP1R/GIPR de tilápia com os recetores homólogos de robalo, takifugu e peixe zebra**

Tilápia	Robalo	Takifugu	Peixe zebra
GCGRa	82	69	62
	88	75	76
GCGRb	88	70	64
	92	78	75
GLPR2	83	73	57
	89	82	73
GIPR	70	-	58
	81		67
GCRPR	73	60	-
	81	71	

Quando se comparam os recetores de tilápia com o celacanto observa-se que o recetor que partilha maior similaridade é o GCRPR (66 % de similaridade em aa) e o menos idêntico é o GCGRb pois este peixe não possui este gene duplicado. O mesmo acontece para a *spotted gar* evidenciando a conservação do GCRPR em peixes (**Tabela 4**).

Através da análise dos 5 recetores da tilápia e sua comparação com os recetores do humano observa-se que a similaridade varia ente os 49 % e os 57 % em aa e o recetor de tilápia que partilha mais similaridade com o humano é o GIPR (**Tabela 4**). O *Xenopus* também apresenta 5 recetores tal como a tilápia e as percentagens de identidade entre os membros desta família entre o anfíbio e o peixe teleósteeo variam entre os 28% para o GLP1R e 55 % em aa para o GCRPR, que é o mais idêntico entre as duas espécies. Quanto à lampreia como as sequências se encontravam bastante incompletas apenas foram calculados valores para o GLP2R que partilha 26% de identidade, e 36% de similaridade em aa com o homólogo da tilápia. A *Ciona* tem 2 recetores identificados GCGR-like a e GCGR-like b, e ambos partilham 44% de similaridade em sequência de aminoácidos com o GCGR de tilápia.

**Tabela 4. Percentagens de identidade e similaridade dos recetores de tilápia com os recetores homólogos em humano, *Xenopus*, celacanto, *spotted gar*, lampreia e *Ciona*.**

Tilápia	GCGRa	GCGRb/GLP1R	GLP2R	GIPR	GCRPR
<b>Humano</b>	41 55	38 49	41 55	42 57	-
<b>Xenopus</b>	36 49	28 38	39 56	43 59	55 72
<b>Celacanto</b>	51 65	34 47	40 57	50 62	54 66
<b><i>Spotted gar</i></b>	56 67	-	49 63	54 62	38 48
<b>Lampreia</b>	-	-	26 36	-	-
<b>Ciona</b>	28 44	28 44	-	-	-

#### 4.1.3.2. Motivos conservados

Análise comparativa entre os diferentes recetores de peixes (tilápia, robalo, takifugu e peixe zebra) permitiu identificar regiões conservadas que têm um papel importante na estrutura e função dos recetores homólogos em humano. Por exemplo todos os recetores identificados de peixes possuem na sua estrutura sete regiões transmembranares muito conservadas bem como seis cisteínas e locais de N- glicosilação (N-x-S ou N-x-T, x representa um aminoácido variável) conservados na região N-terminal da proteína que estão envolvidos na formação do “*ligand-binding pocket*” e consequente ativação do recetor (**Figura 15**) (Cardoso et al., 2006). De uma maneira geral outros motivos funcionalmente importantes em mamíferos e localizados na região N-terminal de todos os recetores das diferentes famílias são o aminoácido aspartato (D) e os motivos C-W-P, C-P e G-x-W (onde x representa um aminoácido variável) (Dealmeida et al., 1998 e Laburthe et al., 2002) (**Figura 15**). Entre as regiões TM5 e 6 o motivo K-L-R/K que permite o acoplamento do recetor à proteína Adenil ciclase e o motivo R-L-A-R/K-S que também facilita o acoplamento do recetor ao complexo proteico Gsa é conservado entre os recetores de peixes com o humano e estes são mantidos relativamente bem conservados em todos os recetores (Cardoso, 2003) (**Figura anexo 1,2,3,4**).

Alinhamentos entre membros da mesma família permitiu identificar alguns motivos potencialmente característicos de cada recetor como por exemplo a existência de 3 locais de

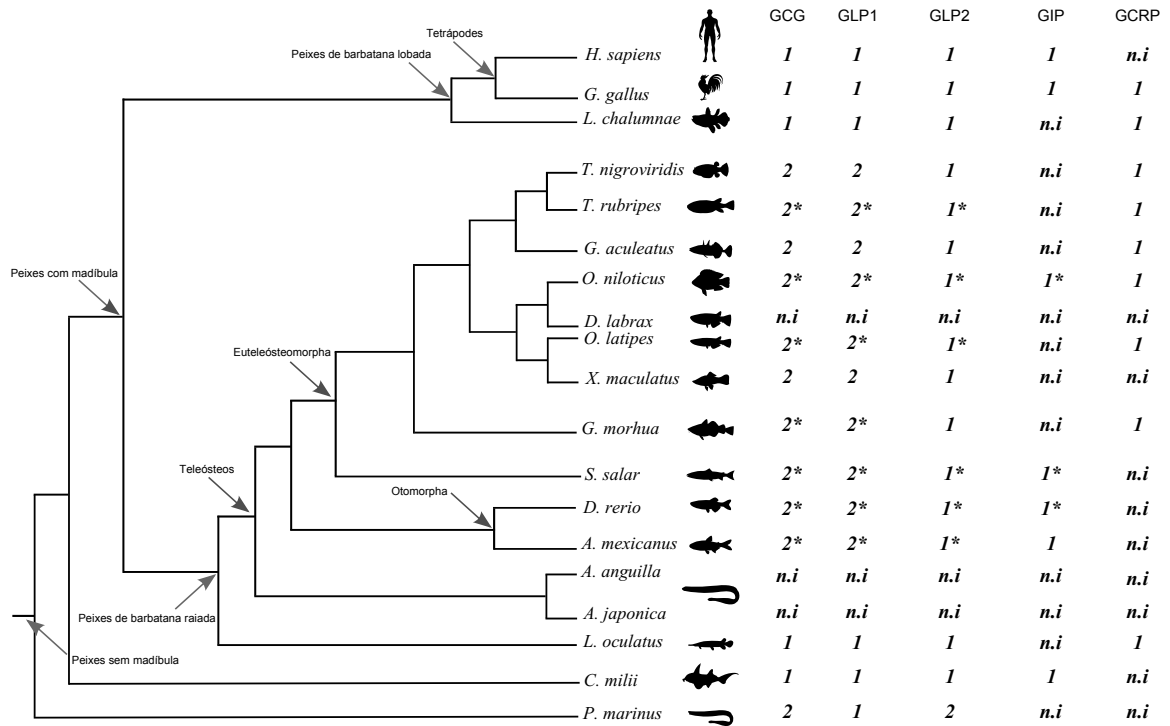
N-glicosilação nos GCGRs e de 2 para os GLP1R e GCGRb de peixes na região N-terminal (**Figura anexo 1**). A existência entre as regiões TM3 e TM4 de locais para a fosforilação da proteína cinase C (PKC, motivo S/T-x-R/K) para os recetores GCGR/GLP1R e GLP2R que não está presente nas sequências do GIPR e GCRPR de peixes teleósteos (**Figura anexo 1, 3, e 4**). Mais ainda, alinhamentos identificaram a degeneração do motivo C-W-P bem como a ausência de duas cisteínas conservadas nas sequências de peixe zebra e de *spotted gar* para os membros do GIPR em peixes (**Figura anexo 3**).

#### **4.2 Péptidos precursores da família GCG/GLP e GIP em peixes**

A pesquisa de similaridade em sequências para identificação de genes putativos precursores para os péptidos GCG/GLP e GIP em peixes teleósteos identificou neste grupo de peixes 2 a 4 genes putativos (**Figura 16**).

GcGrA	-----MSQLFLFLAVLIVSCSIQVSAVVSLQKVTERRWKLRYEE <b>CERNNS</b> -----RDPPTGLV <b>CNRT</b> FNNYA <b>CWP</b> DGL <b>PNTT</b> VVVV <b>C</b> PWYL PWHRKV : 87
GcGrb	-----MSQVCLLALMLCSCRKVSSANSLELVKQWSSYKQKCLDHLG---ATPPATGLV <b>CNRT</b> FDLYA <b>CWP</b> DGHPGTT <b>NVS</b> CPWFLEWYHKV : 87
GLP2R	-----MPAPLPAMHKRTKLLTLLEFLIYNQKVTGSLLESLLAKRNEYK <b>CKNT</b> LVAS---ALSITGNVC <b>KGAF</b> DFMV <b>CWP</b> HSSPG- <b>NVS</b> VP <b>C</b> PSFLEWISDD : 95
GIPR	-----MVAEWMRYNECLVRMS---TEPGPNELVCSRMFDEYA <b>CWS</b> DGQNSTVKV <b>C</b> PWYLEWYNQV : 60
GcRPR	MEEWEERVDIPVWLADRGDVGKGGPSRGICDANSAPFIYSEVEKVGKVL EETRYKWKVQYKED <b>C</b> FNITIRNDCFLFGLPAGL <b>F</b> <b>CNRT</b> FDRYA <b>CWP</b> DTPAGV <b>MNIS</b> <b>C</b> PFYLEWYDKV : 115
GcGrA	QHGYYVQ <b>C</b> DVNGQW <b>T</b> <b>N</b> T <b>S</b> E <b>C</b> D <b>S</b> H <b>E</b> Q <b>V</b> T-----HLVRIQ <b>YV</b> VHIRIMVTVGYSLVALVLA <b>I</b> GILIFFRKLLH <b>C</b> MRN <b>N</b> IHMNLFAS <b>F</b> ILRALSVL <b>I</b> KDALFETSNIAQ <b>G</b> : 194
GcGrb	QDGLVYR <b>F</b> CSE <b>D</b> GK <b>W</b> AQ <b>K</b> N-T <b>S</b> E <b>C</b> EDDPG <b>Q</b> -----Q <b>Y</b> G--RIITQLRIMVTVGYSLGALLI <b>A</b> L <b>G</b> ILIFFRKLLH <b>C</b> MRN <b>N</b> IHMNLFAS <b>F</b> ILRALSVL <b>I</b> KDALLTLIDP <b>R</b> S : 191
GLP2R	T <b>S</b> R <b>S</b> A <b>H</b> R <b>E</b> C <b>L</b> E <b>N</b> G <b>R</b> W <b>R</b> Q <b>M</b> E <b>N</b> S <b>S</b> E <b>F</b> W <b>R</b> D <b>V</b> S <b>E</b> C <b>E</b> E <b>H</b> H <b>F</b> K <b>D</b> E <b>M</b> L <b>R</b> H <b>T</b> A <b>L</b> R <b>L</b> I <b>S</b> V <b>I</b> G <b>S</b> L <b>S</b> V <b>S</b> L <b>I</b> A <b>T</b> L <b>M</b> G <b>M</b> L <b>R</b> K <b>L</b> H <b>C</b> T <b>R</b> N <b>Y</b> I <b>H</b> M <b>N</b> L <b>F</b> V <b>S</b> F <b>I</b> L <b>R</b> A <b>A</b> I <b>L</b> S <b>K</b> E <b>I</b> I <b>M</b> H <b>I</b> M <b>S</b> N <b>L</b> P : 210
GIPR	R <b>S</b> G <b>F</b> V <b>L</b> R <b>E</b> C <b>G</b> P <b>D</b> G <b>K</b> W <b>A</b> T <b>R</b> N <b>S</b> S <b>Q</b> T <b>W</b> R <b>D</b> H <b>S</b> Q <b>Q</b> P <b>E</b> -D <b>S</b> Q <b>Q</b> E <b>E</b> E <b>K</b> Q <b>I</b> I <b>V</b> A <b>C</b> F <b>R</b> V <b>M</b> V <b>T</b> V <b>G</b> S <b>I</b> S <b>V</b> S <b>I</b> C <b>V</b> A <b>L</b> I <b>I</b> L <b>L</b> F <b>F</b> S <b>K</b> L <b>H</b> C <b>T</b> R <b>N</b> Y <b>I</b> H <b>S</b> N <b>L</b> F <b>A</b> S <b>F</b> ILRALSVL <b>I</b> KDAL <b>L</b> G <b>K</b> T <b>Y</b> L <b>E</b> F <b>T</b> : 174
GcRPR	S <b>Q</b> G <b>V</b> R <b>R</b> R <b>C</b> G <b>Y</b> D <b>G</b> H <b>W</b> E <b>R</b> E <b>D</b> N <b>G</b> Q <b>V</b> M <b>R</b> D <b>M</b> T <b>Q</b> E <b>E</b> E <b>K</b> E <b>V</b> A <b>S</b> Q <b>E</b> L <b>M</b> F <b>K</b> Q <b>L</b> M <b>V</b> S <b>F</b> K <b>M</b> L <b>V</b> T <b>V</b> G <b>S</b> L <b>S</b> V <b>S</b> L <b>I</b> T <b>L</b> I <b>F</b> A <b>L</b> I <b>V</b> L <b>L</b> S <b>F</b> R <b>K</b> L <b>H</b> C <b>T</b> R <b>N</b> Y <b>I</b> H <b>A</b> N <b>L</b> F <b>S</b> F <b>I</b> L <b>R</b> A <b>V</b> A <b>V</b> I <b>V</b> K <b>D</b> P <b>M</b> L <b>E</b> H <b>H</b> W <b>G</b> R <b>E</b> I : 230
<b>TM2</b>	
GcGrA	LNRDQ <b>E</b> Q <b>G</b> F <b>P</b> P <b>A</b> S <b>I</b> A <b>P</b> V <b>E</b> Q <b>L</b> V <b>N</b> N <b>E</b> T <b>M</b> I <b>S</b> C <b>R</b> I <b>A</b> M <b>V</b> M <b>Q</b> Y <b>S</b> I <b>M</b> A <b>N</b> S <b>Y</b> M <b>L</b> I <b>V</b> E <b>G</b> I <b>X</b> I <b>H</b> N <b>L</b> L <b>V</b> I <b>T</b> V <b>F</b> T <b>E</b> R <b>N</b> Y <b>E</b> K <b>I</b> Y <b>Q</b> C <b>I</b> G <b>W</b> G <b>T</b> P <b>L</b> I <b>F</b> L <b>V</b> P <b>W</b> V <b>A</b> K <b>Y</b> L <b>Y</b> E <b>N</b> Q <b>H</b> C <b>W</b> E <b>Q</b> N <b>I</b> N <b>M</b> K <b>Y</b> <b>W</b> W <b>I</b> I <b>R</b> A <b>P</b> : 309
GcGrb	NSDSQ-----AR <b>S</b> W <b>N</b> I <b>P</b> A <b>V</b> M <b>M</b> C <b>R</b> G <b>A</b> M <b>V</b> M <b>Q</b> Y <b>S</b> V <b>M</b> A <b>N</b> N <b>Y</b> M <b>L</b> I <b>V</b> E <b>G</b> I <b>X</b> I <b>H</b> S <b>L</b> L <b>V</b> I <b>T</b> V <b>F</b> S <b>E</b> R <b>K</b> Y <b>F</b> I <b>Y</b> I <b>A</b> I <b>G</b> W <b>G</b> A <b>P</b> L <b>I</b> F <b>V</b> L <b>P</b> W <b>I</b> A <b>K</b> Y <b>L</b> Y <b>E</b> N <b>E</b> C <b>W</b> E <b>R</b> N <b>I</b> N <b>M</b> G <b>Y</b> <b>W</b> W <b>I</b> I <b>R</b> S <b>P</b> : 295
GLP2R	KDDPGWN-----T <b>Y</b> S <b>S</b> S <b>P</b> I <b>V</b> I <b>M</b> C <b>R</b> L <b>S</b> K <b>V</b> C <b>M</b> E <b>Y</b> F <b>V</b> A <b>C</b> N <b>Y</b> F <b>W</b> L <b>V</b> E <b>A</b> I <b>F</b> H <b>T</b> L <b>L</b> F <b>A</b> V <b>L</b> T <b>K</b> R <b>C</b> L <b>L</b> K <b>K</b> Y <b>M</b> L <b>L</b> G <b>W</b> G <b>T</b> P <b>A</b> L <b>F</b> V <b>T</b> P <b>W</b> V <b>V</b> K <b>L</b> L <b>Y</b> E <b>N</b> T <b>E</b> C <b>W</b> S <b>I</b> I <b>N</b> -R <b>G</b> F <b>W</b> W <b>I</b> I <b>R</b> G <b>P</b> : 313
GIPR	DNRD <b>V</b> F <b>E</b> V <b>N</b> -----S <b>N</b> O <b>A</b> L <b>S</b> S <b>C</b> L <b>V</b> A <b>Q</b> V <b>L</b> M <b>H</b> Y <b>C</b> V <b>G</b> A <b>N</b> Y <b>M</b> L <b>I</b> V <b>E</b> G <b>L</b> X <b>I</b> H <b>N</b> L <b>L</b> A <b>L</b> M <b>A</b> F <b>S</b> E <b>N</b> H <b>F</b> F <b>G</b> G <b>Y</b> L <b>L</b> I <b>G</b> W <b>G</b> T <b>P</b> V <b>L</b> F <b>V</b> V <b>P</b> W <b>I</b> L <b>V</b> R <b>Y</b> M <b>E</b> D <b>T</b> R <b>C</b> W <b>E</b> I <b>N</b> E <b>N</b> M <b>A</b> Y <b>W</b> C <b>I</b> I <b>R</b> I <b>P</b> : 277
GcRPR	E <b>M</b> L <b>S</b> H <b>Q</b> A <b>A</b> V <b>G</b> C <b>R</b> I <b>A</b> Q <b>V</b> I <b>M</b> Q <b>Y</b> C <b>V</b> L <b>A</b> N <b>H</b> Y <b>F</b> E <b>G</b> E <b>A</b> I <b>L</b> I <b>Y</b> S <b>V</b> L <b>I</b> A <b>S</b> V <b>F</b> I <b>D</b> S <b>N</b> K <b>Y</b> L <b>L</b> I <b>Y</b> L <b>G</b> W <b>G</b> T <b>P</b> L <b>L</b> F <b>V</b> V <b>P</b> W <b>V</b> V <b>K</b> M <b>L</b> K <b>E</b> N <b>K</b> E <b>C</b> W <b>A</b> V <b>N</b> E <b>N</b> M <b>N</b> Y <b>W</b> W <b>I</b> I <b>R</b> F <b>P</b> : 334
<b>TM3</b>	
GcGrA	ILAA <b>V</b> M <b>I</b> N <b>F</b> L <b>I</b> F <b>I</b> H <b>I</b> K <b>I</b> L <b>V</b> S <b>K</b> L <b>R</b> A <b>H</b> -Q <b>M</b> R <b>Y</b> T <b>D</b> Y <b>K</b> F <b>R</b> L <b>A</b> K <b>S</b> T <b>L</b> I <b>P</b> L <b>L</b> I <b>G</b> I <b>H</b> N <b>V</b> V <b>F</b> I <b>F</b> A <b>T</b> D <b>E</b> S <b>T</b> S <b>G</b> S <b>I</b> G <b>L</b> R <b>L</b> T <b>R</b> L <b>F</b> S <b>D</b> L <b>F</b> S <b>S</b> F <b>O</b> G <b>L</b> L <b>V</b> A <b>I</b> L <b>V</b> C <b>F</b> V <b>N</b> K <b>E</b> V <b>Q</b> S <b>E</b> L <b>L</b> K <b>K</b> W <b>K</b> R <b>M</b> K <b>L</b> G <b>R</b> : 423
GcGrb	IL <b>F</b> A <b>L</b> I <b>N</b> F <b>F</b> I <b>F</b> I <b>R</b> I <b>K</b> I <b>L</b> M <b>S</b> K <b>L</b> R <b>A</b> H-Q <b>M</b> R <b>Y</b> T <b>D</b> Y <b>K</b> F <b>R</b> L <b>A</b> K <b>S</b> T <b>L</b> I <b>P</b> L <b>L</b> I <b>G</b> I <b>H</b> A <b>L</b> I <b>F</b> T <b>V</b> D <b>E</b> S <b>V</b> P <b>K</b> S <b>V</b> L <b>R</b> L <b>V</b> R <b>L</b> F <b>C</b> D <b>L</b> L <b>F</b> N <b>S</b> F <b>O</b> G <b>L</b> L <b>V</b> A <b>I</b> L <b>V</b> C <b>F</b> V <b>N</b> K <b>E</b> V <b>Q</b> S <b>E</b> M <b>L</b> K <b>K</b> W <b>K</b> R <b>M</b> K <b>L</b> G <b>K</b> : 409
GLP2R	ITLS <b>V</b> L <b>V</b> I <b>F</b> F <b>I</b> F <b>I</b> K <b>I</b> L <b>M</b> L <b>L</b> S <b>K</b> L <b>K</b> A <b>D</b> -Q <b>V</b> K <b>F</b> T <b>D</b> Y <b>R</b> Y <b>S</b> L <b>A</b> R <b>A</b> T <b>L</b> V <b>L</b> I <b>P</b> L <b>L</b> I <b>G</b> I <b>H</b> E <b>V</b> V <b>T</b> V <b>L</b> I <b>D</b> E <b>C</b> V <b>D</b> G--S <b>S</b> R <b>Y</b> A <b>R</b> N <b>E</b> V <b>A</b> L <b>T</b> S <b>S</b> F <b>O</b> G <b>L</b> V <b>A</b> V <b>L</b> Y <b>C</b> E <b>A</b> N <b>G</b> E <b>V</b> Q <b>A</b> E <b>L</b> K <b>K</b> R <b>W</b> Q <b>L</b> F <b>L</b> F <b>T</b> N : 425
GIPR	IL <b>L</b> A <b>T</b> M <b>N</b> F <b>F</b> I <b>F</b> I <b>R</b> I <b>L</b> I <b>L</b> I <b>S</b> K <b>L</b> R <b>A</b> H-Q <b>M</b> R <b>Y</b> T <b>D</b> Y <b>K</b> F <b>R</b> L <b>A</b> K <b>S</b> T <b>L</b> I <b>P</b> L <b>L</b> I <b>G</b> I <b>H</b> E <b>V</b> F <b>A</b> V <b>L</b> T <b>N</b> V <b>Q</b> T <b>D</b> G--V <b>F</b> R <b>N</b> I <b>N</b> L <b>F</b> F <b>O</b> L <b>F</b> F <b>N</b> S <b>F</b> O <b>G</b> L <b>V</b> A <b>V</b> L <b>V</b> Y <b>C</b> F <b>V</b> N <b>K</b> E <b>V</b> Q <b>A</b> E <b>L</b> K <b>T</b> T <b>W</b> O <b>R</b> L <b>K</b> L <b>W</b> L : 389
GcRPR	VL <b>L</b> A <b>S</b> L <b>I</b> N <b>F</b> L <b>I</b> F <b>T</b> K <b>L</b> L <b>K</b> V <b>I</b> F <b>S</b> K <b>L</b> F <b>A</b> S <b>N</b> P <b>T</b> H <b>Y</b> P <b>D</b> Y <b>K</b> F <b>R</b> L <b>A</b> K <b>A</b> T <b>L</b> L <b>I</b> P <b>L</b> I <b>F</b> G <b>I</b> H <b>E</b> V <b>I</b> F <b>V</b> F <b>A</b> T <b>D</b> E <b>Q</b> T <b>T</b> G--V <b>L</b> R <b>Y</b> I <b>K</b> V <b>E</b> F <b>L</b> F <b>I</b> S <b>S</b> F <b>O</b> G <b>L</b> V <b>A</b> V <b>L</b> Y <b>C</b> F <b>G</b> N <b>K</b> E <b>V</b> Q <b>A</b> E <b>L</b> K <b>R</b> K <b>K</b> V <b>G</b> S <b>W</b> R <b>M</b> G <b>T</b> : 447
<b>TM5</b>	
GcGrA	NIEE <b>F</b> R <b>H</b> T <b>S</b> N <b>T</b> P <b>N</b> T <b>K</b> T <b>A</b> S <b>L</b> L <b>N</b> -----H <b>A</b> P <b>R</b> M <b>P</b> L <b>P</b> D <b>I</b> A <b>K</b> T <b>T</b> A <b>P</b> V <b>C</b> S <b>P</b> E <b>E</b> R <b>H</b> L <b>V</b> A <b>S</b> N <b>Q</b> M <b>V</b> H <b>S</b> -----T <b>E</b> E <b>G</b> C <b>A</b> S <b>L</b> L <b>H</b> E <b>G</b> T <b>I</b> S <b>N</b> F <b>L</b> V <b>E</b> D <b>I</b> S <b>N</b> F <b>L</b> V <b>E</b> D <b>I</b> S <b>T</b> D <b>K</b> L <b>Q</b> C <b>Y</b> E <b>V</b> O <b>K</b> E <b>N</b> M <b>E</b> S : 526
GcGrb	D <b>I</b> D <b>E</b> E <b>R</b> H <b>T</b> H <b>S</b> Q <b>T</b> P <b>H</b> V <b>K</b> S <b>G</b> S <b>I</b> A <b>T</b> C <b>N</b> V <b>P</b> N <b>T</b> S <b>D</b> P <b>S</b> A <b>D</b> M <b>P</b> R <b>F</b> N <b>K</b> A <b>N</b> S <b>G</b> P <b>V</b> C <b>A</b> A <b>T</b> E <b>N</b> R <b>K</b> L <b>V</b> V <b>S</b> F <b>N</b> G <b>T</b> K <b>C</b> R <b>P</b> V <b>K</b> S <b>R</b> H <b>T</b> L <b>H</b> S <b>F</b> Q <b>S</b> H <b>R</b> G <b>A</b> T <b>S</b> T <b>A</b> T <b>E</b> D <b>V</b> C <b>L</b> E <b>E</b> R <b>V</b> K <b>Y</b> R <b>S</b> T <b>Y</b> L <b>E</b> G <b>E</b> E <b>T</b> : 524
GLP2R	H <b>F</b> K <b>V</b> R <b>T</b> C <b>F</b> R <b>G</b> M <b>P</b> L <b>K</b> H <b>L</b> W <b>K</b> C <b>T</b> R <b>G</b> -----H <b>H</b> P <b>R</b> C <b>R</b> Q <b>S</b> D <b>S</b> Y <b>D</b> E <b>G</b> G <b>I</b> S <b>T</b> V <b>H</b> P <b>H</b> L <b>L</b> Q <b>V</b> A <b>V</b> H <b>G</b> R <b>G</b> R <b>V</b> L <b>I</b> G <b>E</b> V <b>K</b> Q <b>A</b> L <b>N</b> G <b>Y</b> D <b>T</b> V <b>T</b> G <b>L</b> E <b>F</b> L <b>T</b> R <b>K</b> S <b>L</b> S <b>S</b> D <b>G</b> E <b>M</b> L <b>I</b> G <b>E</b> T <b>M</b> E <b>E</b> I <b>L</b> E <b>E</b> : 528
GIPR	T <b>Y</b> L <b>D</b> E <b>L</b> R <b>N</b> S <b>G</b> S <b>N</b> T <b>L</b> Q <b>T</b> P-----V <b>S</b> M <b>P</b> P <b>S</b> Q <b>C</b> H <b>Q</b> L <b>S</b> L <b>Y</b> K <b>L</b> P <b>D</b> G-----C <b>P</b> E <b>V</b> S <b>H</b> L <b>S</b> P <b>M</b> L <b>H</b> T <b>S</b> L <b>S</b> P <b>A</b> P <b>H</b> P <b>Q</b> V <b>P</b> I <b>P</b> N <b>S</b> Y <b>V</b> Y <b>H</b> Q <b>D</b> K <b>M</b> G <b>K</b> -- : 465
GcRPR	ET <b>V</b> C <b>C</b> G <b>Q</b> ----- : 454
GcGrA	HL- : 528
GcGrb	NV- : 526
GLP2R	SEF : 531
GIPR	--- : -
GcRPR	--- : -

**Figure 15. Alinhamento de seqüências de aminoácidos dos 5 recetores de tilápia.** As 6 cisteínas, outros domínios/motivos conservados e as 7 regiões transmembranares estão assinaladas. As letras assinaladas a negrito correspondem aos locais de N-glicosilação. A sublinhado encontra-se a região do peptídeo sinal nas seqüências. Os motivos funcionais característicos encontram-se dentro de caixas.



**Figura 16. Número de membros da família dos GCG/GLPs e GIP identificados nos genomas de vários peixes.** A relação filogenética entre as linhagens de peixes encontra-se representada. Os “\*” representam genes cuja sequência foi confirmada pela existência de ESTs. n.i. indica “não identificado” pelas pesquisas realizadas.

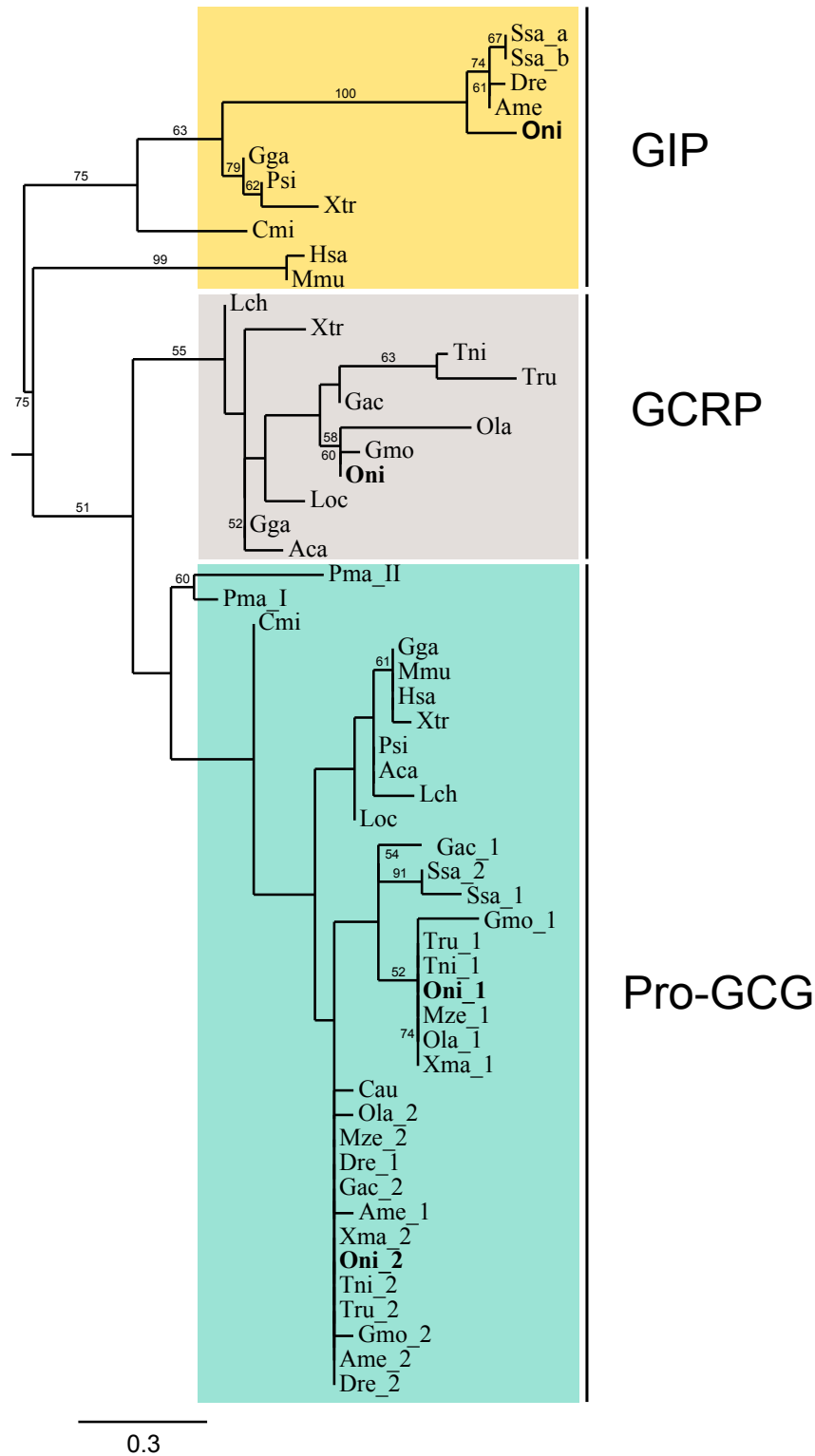
Em todos os peixes teleósteos dois dos genes identificados correspondem aos duplicados do *proglucagon* de peixe zebra (*proGCG1* incluiu GCG, GLP-1 e GLP-2; *proGCG2* inclui GCG e GLP-1). Só em tilápia, salmão, e peixe das cavernas é que um gene putativo para o precursor do GIP foi identificado (**Tabela anexo 4**) e homólogos do novo peptídeo GCRP foram identificados em todos os peixes teleósteos à exceção de robalo, *platyfish*, salmão, peixe zebra e peixe das cavernas (**Figura 16**). O número variável de genes identificados sugere que a evolução dos membros desta família foi bastante flexível em peixes teleósteos e que em peixes a taxa de retenção de genes é distinta. Na *spotted gar* e no celacanto dois genes: um para o glucagon e um para o GCRP foram identificados. No peixe cartilágneo dois genes também foram identificados um deles é o *proglucagon* e outro corresponde ao GIP. Pesquisas realizadas no genoma das lampreias só identificaram genes

homólogos para os dois *proglucagons* o *proglucagon* I (constituído por GCG, GLP-1 e GLP-2) e *proglucagon* II (com GCG e GLP-2) (Irwin et al., 1999). Pesquisas no genoma de humano confirmaram a existência de 2 genes, um para o *proglucagon* e outro para o GIP e a galinha apresenta um gene *proglucagon*, um GIP e um gene GCRP (**Figura 16**).

Pesquisas em bases de dados de ESTs identificaram clones que confirmam a previsão dos genes bem como permitiram alargar o número de sequências identificadas em peixes para melhor compreender a sua evolução e ter uma ideia sobre a sua distribuição tecidual. ESTs para o *proglucagon*1 foram identificados na *medaka* (*Oryzias latipes*, 1), salmão (*Salmo salar*, 1), bacalhau (*Gadus morhua*, 6), peixe zebra (*Danio rerio*, 6), peixe das cavernas (*Astyanax mexicanus*, 2), em *killifish* (*Nothobranchius furzeri*, 4), barramundi (*Lates calcarifer*, 1), e no ciprinidiforme o peixe de cabeça gorda (*Pimephales promelas*, 2) e foram isolados não só na fase de embrião e larvar, mas também no intestino, fígado, cérebro e ovário de adulto. O número de EST identificados para o *proglucagon* 2 é variável mas encontra-se numa maior diversidade de peixes e foram identificados em *medaka* (*Oryzias latipes*, 4), salmão (*Salmo salar*, 2), bacalhau (*Gadus morhua*, 1), peixe zebra (*Danio rerio*, 3), tilápia (*Oreochromis niloticus*, 7), no peixe balão (*Takifugu rubripes*, 1) e também em outras espécies que não têm o genoma sequenciado tal como a truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*, 6), no *killifish* (*Nothobranchius furzeri*, 18), no peixe gato (*Ictalurus furcatus*, 2), na dourada (*Sparus aurata*, 5), no peixinho raro (*Gobiocypris rarus*, 1) e na truta (*Oncorhynchus tshawytscha*, 2) e os clones foram isolados na fase embrionária e larvar, juvenil e em ovários, intestinos, fígado, cérebro e brânquias. ESTs para o GIP foram encontrados em peixe lúcio (*Esox lucius*), no salmão (*Salmo salar*), no peixe zebra, (*Danio rerio*), e na tilápia (*Oreochromis niloticus*). A sua expressão verifica-se ao nível de uma grande variedade de órgãos entre os quais: coração, rim, fígado, cérebro, tiróide, testículos, brânquias e baço (**Tabela anexo 5**)

#### 4.2.1 Análise filogenética

Com os resultados das pesquisas das sequências dos diferentes ligandos efetuou-se uma árvore filogenética com o objetivo de caracterizar a evolução dos peptídeos da família do GCG/GIP. Na árvore obtida observa-se a existência de três grupos distintos: o *proglucagon*, o GCRP e o GIP (**Figura 17**). Gene percursores para os péptidos da família glucagon foram retirados dos genomas de vários vertebrados e nenhum gene putativo foi identificado nos invertebrados anfioxo e *Ciona*. Recentemente, potenciais genes para os péptidos desta família e péptidos das secretinas (família relacionada) (*Ciona* 1 gene e anfioxo 4 genes) foram descritos nestas espécies mas as suas sequências partilham muito pouca similaridade para as dos vertebrados, e quando existe é restrita para pequenos motivos de aminoácidos dentro da região prevista para o péptido maduro e por esta razão decidiu-se não utilizá-las na análise filogenética que foi realizada com o precursor completo (Mirabeau e Joly, 2013).



**Figura 17.** Árvore filogenética obtida com o método de *maximum likelihood* dos membros da família do GCG/GLP e GIP de peixes e outros vertebrados. A árvore filogenética foi construída utilizando um alinhamento com as seqüências de aminoácidos de diferentes vertebrados do precursor completo de acordo com o modelo JTT+I+G (gama shape=1.404 e i= 0.007 e análise estatística de *bootstrap* de 100 réplicas. Nome completo das espécies utilizadas na árvore estão indicadas na **Tabela anexo 4**. Os números 1 e 2

representam o proGCG 1 (GCG+GLP1+GLP2) e proGCG 2 (GCG+GLP1), na lampreia (Pma) I (GCG+GLP1+GLP2) e lampreia (Pma) II (GCG+GLP2).

A análise geral parece indicar que, de acordo as ramificações, os três grupos de péptidos precursores partilham uma origem comum, que o *proglucagon* e o GCRP parecem ser mais relacionados filogeneticamente, e que o GIP divergiu a partir de um processo de duplicação que também originou o GCRP/*proglucagon* precursor. Todas as sequências identificadas em peixes agrupam de acordo com a sua similaridade e o grupo do *proglucagon* encontra-se duplicado em peixes. As sequências previamente isoladas de lampreia *proglucagon I* e *II* agrupam na base da divergência dos precursores homólogos, e a existência de dois genes precursores parece ter sido o resultado de uma duplicação específica em lampreia (**Figura 17**). O mesmo parece acontecer para os dois *proglucagons* identificados em salmão, que agrupam no *cluster* do *proglucagon 1* mas correspondem a dois *proglucagon 1* duplicados. O *proglucagon* do peixe das cavernas e do peixe zebra agrupam com os *proglucagons 2* de outros teleósteos sugerindo que estes também são o resultado de uma duplicação após a divergência dos peixes teleósteos.

#### 4.2.2 Análise comparativa de sequências de ligandos em peixes

A comparação entre as sequências obtidas de vários peixes com os homólogos em outros vertebrados permitiu caracterizar a estrutura dos precursores para o *proglucagon*, GIP e GCRP (**Figura anexo 5, 6 e 7**) bem como o alinhamento dos péptidos maduros possibilitou a identificação de motivos de aminoácidos conservados que se mantiveram durante o processo evolutivo e que poderão ser funcionalmente importantes também em peixes (**Figura 18**). O alinhamento de sequências indica que em peixes o *proglucagon 1* contém as sequências para os péptidos GCG, GLP-1 e GLP-2 e o *proglucagon 2* só codifica para o GCG e GLP-1 e estes resultam da transcrição de dois genes independentes. Em geral, o alinhamento entre os péptidos maduros permitiu identificar vários aminoácidos ou motivos de aminoácidos conservados entre as diferentes espécies tal como o motivo H<sup>1</sup>, G<sup>4</sup>-T<sup>5</sup>, D<sup>9</sup>, L<sup>14</sup>, F<sup>22</sup> e W<sup>25</sup>-L<sup>26</sup> (**Figura 18**).

<b>GCG</b>		
Humano	: HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-----	: 29
Galinha	: HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMST-----	: 29
Celacanto	: HSQGTFTSDYTKYLDTRRAQDFVQWLMST-----	: 29
Tilápia_1	: HSEGTFSNDYSKYLEDRKAQDFVRLMNN-----	: 29
Tilápia_2	: HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVQWLKNS-----	: 29
Takifugu_1	: HSEGTFSNDYSKYLEDRKAQDFVRLMNN-----	: 29
Takifugu_2	: HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVQWLKNS-----	: 29
Peixe zebra_1	: HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVQWLMNA-----	: 29
Peixe zebra_2	: HSEGTFSNDYSKYLETRRAQDFVQWLMNS-----	: 29
Spotted gar	: HSQGTFTNDYSKYLDTRRAQDFVQWLMST-----	: 29
Lampreia I	: HSEGTFTSDYSKYLENKQAKDFVRLMNA-----	: 29
Lampreia II	: HSQGSFTSDYSKHLQAKDFVRLMNT-----	: 29
<b>GLP1</b>		
Humano	: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-----	: 31
Galinha	: HAEGTYTSDITSYLEGQAAKEFIAWLVNVRG-----	: 31
Tilápia_1	: HADGTFTSDVSSFLKQAIKDFVANLKSQGV-----	: 31
Tilápia_2	: HADGTFTSDVSSYLQDQAAKEFVSWLKTGRG-----	: 31
Takifugu_1	: HADGTFTSDVSSYLKQAIKDFVARLQAGQV-----	: 31
Takifugu_2	: HADGTFTSDVSTYLQDQAAKEFVSWLKTGPG-----	: 31
Peixe zebra_1	: HAEGTYTSDVSSYLQDQAAQSFVAWLKSGQP-----	: 31
Peixe zebra_2	: HADGTFTSDVSSYLQDQAAKEFVSWLKTGRG-----	: 31
Spotted gar	: HADGTFTSDVSSYLQDQAAKFFVTLKQGGD-----	: 31
Lampreia I	: HADGTFTNDMTSYLDAKAARDFVSWLARS DK-----	: 31
<b>GLP2</b>		
Humano	: HADGSFSDENNTILDNLAARDFINWLIQTKITDRK-----	: 35
Galinha	: HADGTFTSDINKILDDMAAKEFLKWLINTKVTQRD-----	: 35
Celacanto	: HADGSFTSDINKVLDTIAAKEFLNWLINSKDSQPR-----	: 35
Tilápia_1	: HVDGSFTSDVNKVLDSMAAKEYLLWVMTSKPSGES-----	: 35
Takifugu_1	: HVDGTFTSDVNKVLDSMAAKEYLLWVMSKPSGER-----	: 35
Peixe zebra_1	: HVDGSFTSDVNKVLDSIAAKEYLQVWVMSKASGTS-----	: 35
Spotted gar	: HADGSFTSDVNNVLDSIAAKEFIIWVMSKPSSES-----	: 35
Lampreia I	: HAE----DVNALLDRMTAKTFIEWLEKQNSNDQA-----	: 30
Lampreia II	: HSDGSFTNDMNVLDRMSAKNLEWLKQOGRG-----	: 32
<b>GCRP</b>		
Galinha	: HSEGTFTSDFTRYLDKMKAKDFVHWL-----	: 26
Celacanto	: HSEGTFTSDFTRYLDKMKAKDFVRL-----	: 26
Tilápia	: HSDGTFTSDFTHYLDKIKAKDFVEWL-----	: 26
Takifugu	: HSEGTFSHDFSRYLDKIKTKAFVEWL-----	: 26
Spotted gar	: HSEGTFSDFTRYLDRIKAKDFVHWL-----	: 26
<b>GIP</b>		
Humano	: YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ	: 42
Galinha	: YSEATLASDYSRTMDNMLKKNFVEWLLARREKSDNVIEPYK	: 42
Tilápia	: YAESTIASDFSKIMDSMVQKNFVFNLLNQRKSEPALTEAL	: 35
Peixe zebra	: YAESTIASDISKIVDSMVQKNFVFNLLNQRKSEPALTEAL	: 42
Peixe das cavernas	: YAESTIASDISKIMDSMVQKNFVFNLLNQRKSMPTTMP--	: 40

**Figura 18. Alinhamento múltiplo da sequência deduzida do péptido maduro dos membros da família do GCG, GLP e GIP identificados em peixes com os homólogos em humano e galinha.** As sombras indicam conservação entre os diferentes péptidos e o tamanho dos péptidos deduzidos em aminoácidos também se encontra descrito. Sequências deduzidas do *proglucagon 1* e *proglucagon 2* estão indicados com o sufixo 1 e 2, respetivamente a sublinhado estão os aminoácidos que foram identificados como responsáveis pela interação com o recetor em humano.

#### 4.2.2.1 O Proglucagon em peixes

Quando se compara o precursor do *proglucagon* 1 de humano, galinha, celacanto tilápia, *takifugu*, peixe zebra, *spotted gar* e lampreia, verifica-se que partilham uma elevada similaridade e que as sequências dos peixes teleósteos nomeadamente, tilápia e o *takifugu* são as mais idênticas em termos de sequência de aminoácidos (74 % identidade) e as sequências da lampreia as mais divergentes partilhando em geral entre 18-33% de identidade em aa com os outros vertebrados para o *proglucagon* 1 ou 2. O celacanto e a *spotted gar* só apresentam um *proglucagon* que partilha 40 % e 49 % de identidade em aa com o humano, respetivamente (**Tabela anexo 6**). Em tilápia as sequências dos dois precursores são 38 % idênticas em aa.

Entre os péptidos maduros a similaridade é bastante mais elevada, com o peptídeo maduro GCG em peixes a partilhar mais de 72% de identidade com o humano. Entre peixes a identidade é 100% entre o GCG (1) e GCG (2) de tilápia e *takifugu*, respetivamente (**Tabela anexo 9**). O alinhamento de sequências indica que os péptidos maduros são bastante conservados e que essa conservação é maior na extremidade N- terminal. O peptídeo GCG tem início com os aminoácidos H<sup>1</sup> e S<sup>2</sup> em todos as espécies e varia no aminoácido seguinte que pode ser um Q<sup>3</sup> ou E<sup>3</sup>, e verifica-se que o início H<sup>1</sup>-S<sup>2</sup>-E<sup>3</sup> é consistente em todos os peixes e também na lampreia I (**Figura 18 e Figura anexo 5**) (Hwang et al., 2014).

O péptido maduro GLP-1, tal como o GCG, é bastante conservado entre peixes e as duas formas de GLP-1 partilham uma identidade superior a 64 % em sequência de aa, sendo a sequência de tilápia GLP-1 (2) e peixe zebra GLP-1 (2) 100 % idênticas. A sequência deduzida dos peptídeos maduros de tilápia GLP-1 (1) e GLP-1 (2) partilham 61 % e 74 % em aa com o homólogo em humano e este partilha 64 % e 48 % identidade em aa com a sequência para o GLP-1 deduzida de *spotted gar* e de lampreia (Tabela anexo 10). A comparação entre as sequências de péptidos maduros permitiram verificar que em humano, na galinha e no peixe zebra o péptido GLP-1 inicia a sequência com H<sup>1</sup>-A<sup>2</sup>-E<sup>3</sup>, e os restantes com H<sup>1</sup>-A<sup>2</sup>-D<sup>3</sup> havendo uma mutação no terceiro aminoácido. Em humano os aminoácidos H<sup>1</sup>, T<sup>7</sup>, A<sup>18</sup>-A<sup>19</sup>-T<sup>20</sup>, F<sup>22</sup>-I<sup>23</sup> e L<sup>26</sup>-V<sup>27</sup> foram identificados como responsáveis pela interação com o recetor e verificam-se que foram na generalidade mantidos de forma conservada em peixes (**Figura 18 e Figura anexo5**) (Moon et al., 2012).

O peptídeo GLP-2 em humano, na galinha e no celacanto apresenta, na região N-terminal da sequência, os aminoácidos H<sup>1</sup>-A<sup>2</sup>-D<sup>3</sup> no início. Na lampreia como existem duas sequências para o GLP-2 uma tem início com H<sup>1</sup>-A<sup>2</sup>-E<sup>3</sup> e outra com H<sup>1</sup>-S<sup>2</sup>-D<sup>3</sup>, e nos restantes peixes que constam no alinhamento os aminoácidos H<sup>1</sup>-V<sup>2</sup>-D<sup>3</sup> foram identificados no início da sequência. Foram ainda identificados na sequência do peptídeo GLP-2 do humano os resíduos D e K que se encontram assinalados na (**Figura 18 e Figura anexo 5**), como elementos importantes na interação com o recetor, o K é conservado também nas outras espécies, mas o D não (Moon et al.,2012).

#### 4.2.2.2 O precursor do GIP em peixes

Quanto à comparação das sequências do humano, galinha, tilápia, peixe zebra e peixe das cavernas, relativamente ao GIP, observa-se que a percentagem de identidade mais baixa é entre a tilápia e o humano e os valores mais elevados registam-se entre o peixe das cavernas e a tilápia com 36 % de identidade em aa (Tabela anexo 7). Quando, por comparação de sequências, se avaliou apenas o peptídeo maduro verificou-se que a maior percentagem de identidade é de 80 % entre o peixe zebra e o peixe das cavernas (**tabela anexo 12**). O número de aminoácidos que constitui o péptido maduro, nas espécies estudadas varia entre 35 a 42. Ao contrário dos outros membros desta família que iniciam com H<sup>1</sup> o péptido GIP tem início, em todas as espécies utilizadas no alinhamento, com o aminoácido Y<sup>1</sup> e, enquanto que na maioria das espécies o início é Y<sup>1</sup>-A<sup>2</sup>-E<sup>3</sup>, na galinha o péptido inicia com Y<sup>1</sup>-S<sup>2</sup>-E<sup>3</sup>. No alinhamento do peptídeo maduro apenas o aminoácido F<sup>22</sup> é conservado em todas as espécies e os motivos G-T e W-L conservados nos outros membros desta família são degenerados à exceção do humano. Estudos de mutação do GIP em humano identificaram os resíduos E<sup>3</sup>, D<sup>9</sup>, F<sup>22</sup>-V<sup>23</sup> e L<sup>26</sup>-L<sup>27</sup> como elementos chave na interação ligando/recetor que de certa forma se mantêm relativamente constantes entre as espécies analisadas (Moon et al.,2012). O K<sup>30</sup> também foi indiciado como importante neste processo, no entanto nas outras espécies este aminoácido é substituído por R<sup>30</sup>. A H<sup>1</sup> e T<sup>7</sup>/S<sup>7</sup> são conservados regra geral em todos os péptidos à exceção do GIP com Y<sup>1</sup> e I<sup>7</sup> ou A<sup>7</sup> o que poderá indicar locais importantes responsáveis por uma interação seletiva (**Figura 18**) (Hwang et al., 2014).

#### 4.2.2.3 O precursor para o GCRP em peixes

Para o novo peptídeo não foi identificado nenhum precursor mas fragmentos de DNA genómico com sequências semelhantes à inicialmente identificada e descrita da galinha foram

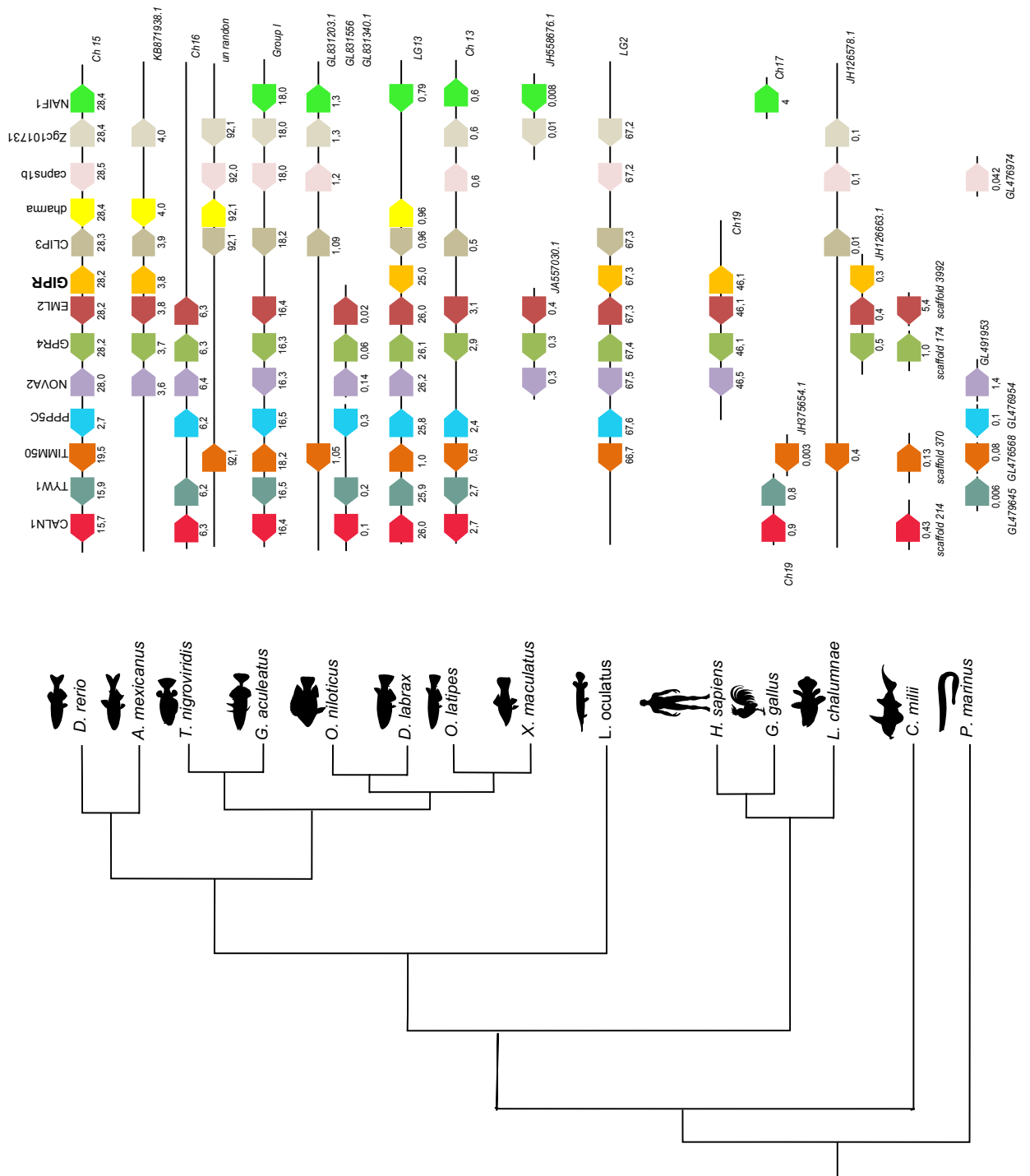
identificados. A identificação deste péptido é relativamente recente e pouco se sabe acerca da sua função e motivos funcionais. Toda a análise comparativa desenvolvida se baseia na comparação das sequências com o péptido maduro deduzido da galinha. A comparação entre os peixes (takifugu *vs* tilápia) e peixes com outros tetrápodes (takifugu *vs* galinha) revelou que a sequência do GCRP é bastante conservada (75 % similaridade) (**Tabela anexo 13**) (**Figura 18**).

### 4.3 Análise de linkage

A identificação dos genes para o GIPR e GIP no genoma de algumas espécies de peixes e a sua aparente ausência, quer para o recetor quer para o seu péptido ativador, em outras espécies de peixes filogeneticamente relacionados sugere que a evolução deste sistema em peixes foi bastante flexível e que sofreu diferentes pressões seletivas. Para melhor compreender o contexto da evolução do GIPR e GIP nos genomas de peixes o ambiente genómico entre as diferentes espécies de peixes foi comparado incluindo outros vertebrados tal como o homem, a galinha, o celacanto, o peixe cartilágneo e a lampreia (**Figura 19 e Figura 20**).

A análise geral do fragmento de cromossoma que contém o gene para o GIPR em peixe zebra foi utilizado como modelo de origem para a comparação visto que foi o primeiro recetor GIPR descrito e encontra-se mapeado no genoma de peixe zebra (**Figura 19**). A análise comparativa da posição dos genes vizinhos do GIPR de peixe zebra com regiões de cromossomas homólogos em outras espécies revelou que existe um padrão de genes muito semelhante e que os mesmos genes que se encontram em redor o GIPR no peixe zebra também se encontram na região do genoma que circunda o GIPR do robalo, do peixe das cavernas, no *spotted gar* bem como no humano e no celacanto (**Figura 19**). Na generalidade o gene GIPR encontra-se sempre muito próximo dos genes GPR4 e EML2 tal como do gene CLIP3. No entanto, nos genomas de outras espécies de peixes tal como no *Tetraodon*, no *stickleback* (Esgana-gata), na tilápia, na *medaka* e no *platyfish* o mesmo padrão de genes foi também identificado contudo o gene para o GIPR parece estar ausente e, em algumas espécies estes genes encontram-se divididos por dois segmentos de cromossomas, sugerindo que esta região sofreu diferentes pressões evolutivas nas diferentes espécies (**Figura 19**). Curioso é o facto de o GIPR ter sido isolado em tilápia nas pesquisas de similaridade de sequências no genoma desta espécie e não terem identificado este gene na região do genoma onde se encontra o padrão de genes que acompanha o GIPR de peixe zebra, sendo estes encontrados

em dois fragmentos de cromossomas diferentes o que indica que o genoma desta espécie parece que não está bem anotado. O celacanto, um peixe que está na base da origem dos tetrápodes, também tem o GIPR já descrito no seu genoma que se encontra ladeado pelo EML2 e GPR4 no cromossoma JH126663.1, enquanto que no tubarão elefante (que não possui GIPR) todos os genes encontrados mapeiam para regiões do genoma distintas e o mesmo acontece na lampreia (**Figura 19**).

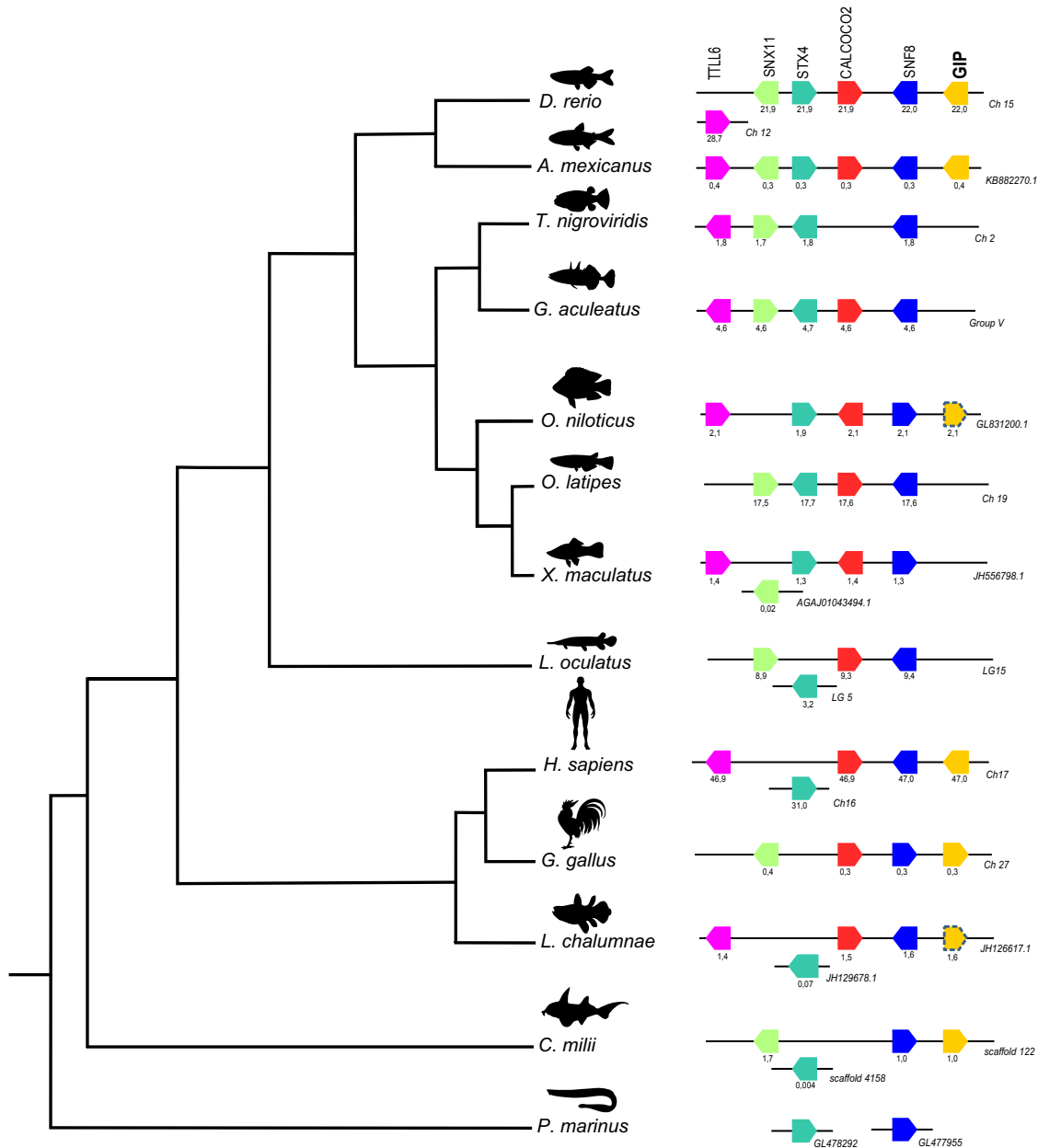


**Figura 19. Esquema representativo da análise de sintenia de ambiente genómico para o GIPR.** Genes vizinhos do GIPR em humano, galinha, celacanto, *spotted gar*, peixe zebra, peixe das cavernas, peixe balão (*tetraodon*), esgana-gata (*stickleback*), tilápia, robalo, *medaka*, *platyfish*, tubarão elefante e lampreia estão representados com diferentes cores com a identificação da posição e do cromossoma em cada uma das espécies representadas.

Em humano verifica-se a presença de um bloco de 3 genes (NOVA2, GPR4, EML2) todos eles no mesmo cromossoma que também estão muito próximos do GIPR no peixe zebra. No genoma da galinha o GIPR é ausente apesar de ter 4 genes (CALN1, TYW1, TIMM50, NAIF1) dos que existem no ambiente genómico do peixe zebra mas muito repartidos (**Figura 19**).

Para o gene do peptídeo GIP uma análise semelhante à realizada para os recetores foi efetuada e foram identificados 5 genes TTL6, SNF8, CALCOCO2, STX4 e SNX11 que fazem parte da região do genoma onde se encontra o GIP de peixes e outros vertebrados, sendo que o SNF8 encontra-se muito próximo do péptido (**Figura 20**). Em espécies onde o GIP não foi identificado tal como no genoma do *tetraodon*, *stickleback*, *medaka*, *platyfish* e *spotted gar* os genes vizinhos existem e as suas posições no genoma são conservadas. A posição do gene GIP foi identificada na tilápia e no celacanto, ainda que não esteja previsto no seu DNA genómico. É importante referenciar ainda que em todos os organismos que não revelam ter o peptídeo, tal como a lampreia, verificou-se a existência do gene SNF8 mas não foi identificado nenhum GIP (**Figura 20**).

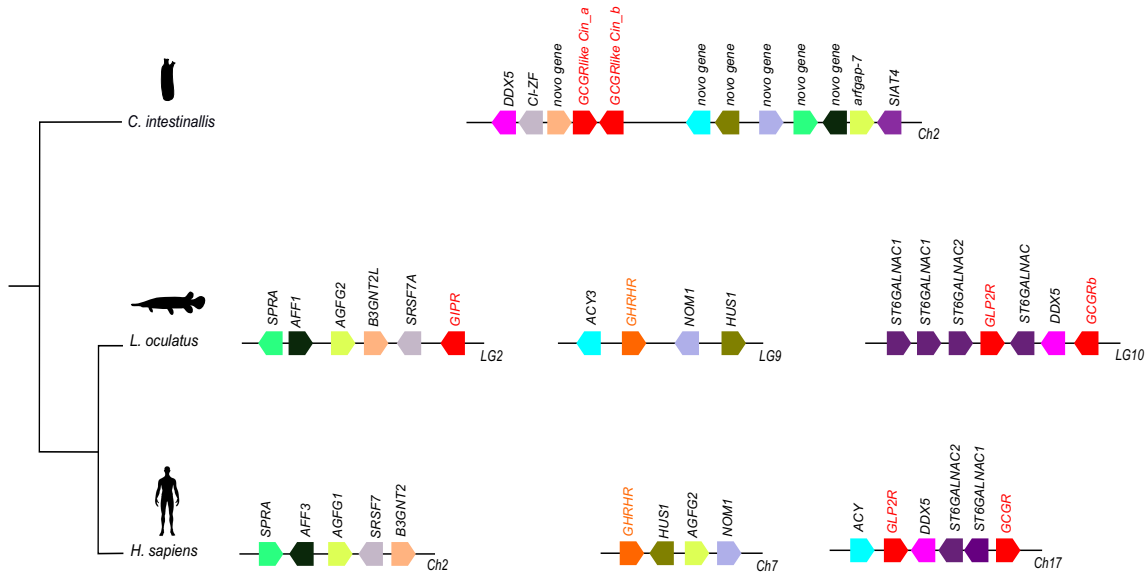
Análise de genes de *linkage* foi também realizada para compreender como os genes para o GCGR/GLP identificados no invertebrado *Ciona intestinalis* se relacionam com os seus homólogos em vertebrados e para caracterizar a evolução dos membros desta família em vertebrados (**Figura 21**). Em *Ciona* existem dois genes putativos GCGR-like que se encontram muito próximos no cromossoma 2 e isto indica que estes possam ter sido originados por um evento de duplicação em *tandem* no genoma desta espécie. Os genes vizinhos para os recetores de *Ciona* foram identificados nas regiões homólogas (que contêm recetores para o GCGR/GLP1R e GIPR) na *spotted gar* e em humano e um padrão de genes semelhantes foi identificado. No *spotted gar* os genes vizinhos encontram-se distribuídos nos cromossomas LG2 onde mapeia o GIPR e LG10 onde se encontra o GCGR e GLP-2 enquanto que no humano ficam distribuídos no cromossoma 17 onde se encontra o GCGR e o GLP2R mas também em dois cromossomas o 2 e 7 onde não existem recetores da família dos GCGR/GLP1R (**Figura 21**).



**Figura 20. Esquema representativo da análise de sintenia de gene do ambiente genómico do GIP.** Genes vizinhos do GIP em humano, galinha, celacanto, *spotted gar*, peixe zebra, peixe das cavernas, peixe balão (*tetraodon*), esgana-gata (*stickleback*), tilápia, *medaka*, *platyfish*, tubarão elefante e lampreia estão representados com diferentes cores e com identificação da posição e do cromossoma em cada uma das espécies representadas.

O ambiente genómico encontrado conservado para o GIPR de *spotted gar* encontra-se no cromossoma 2 em humano evidenciando os diferentes eventos de duplicação e rearranjos no genoma que se verificaram durante a evolução. Curioso foi identificar conservação tanto no genoma da *spotted gar* como no humano para uma região do genoma (no *spotted gar* LG9 e no cromossoma 7 de humano) que contém o recetor GHRH que também é um membro da

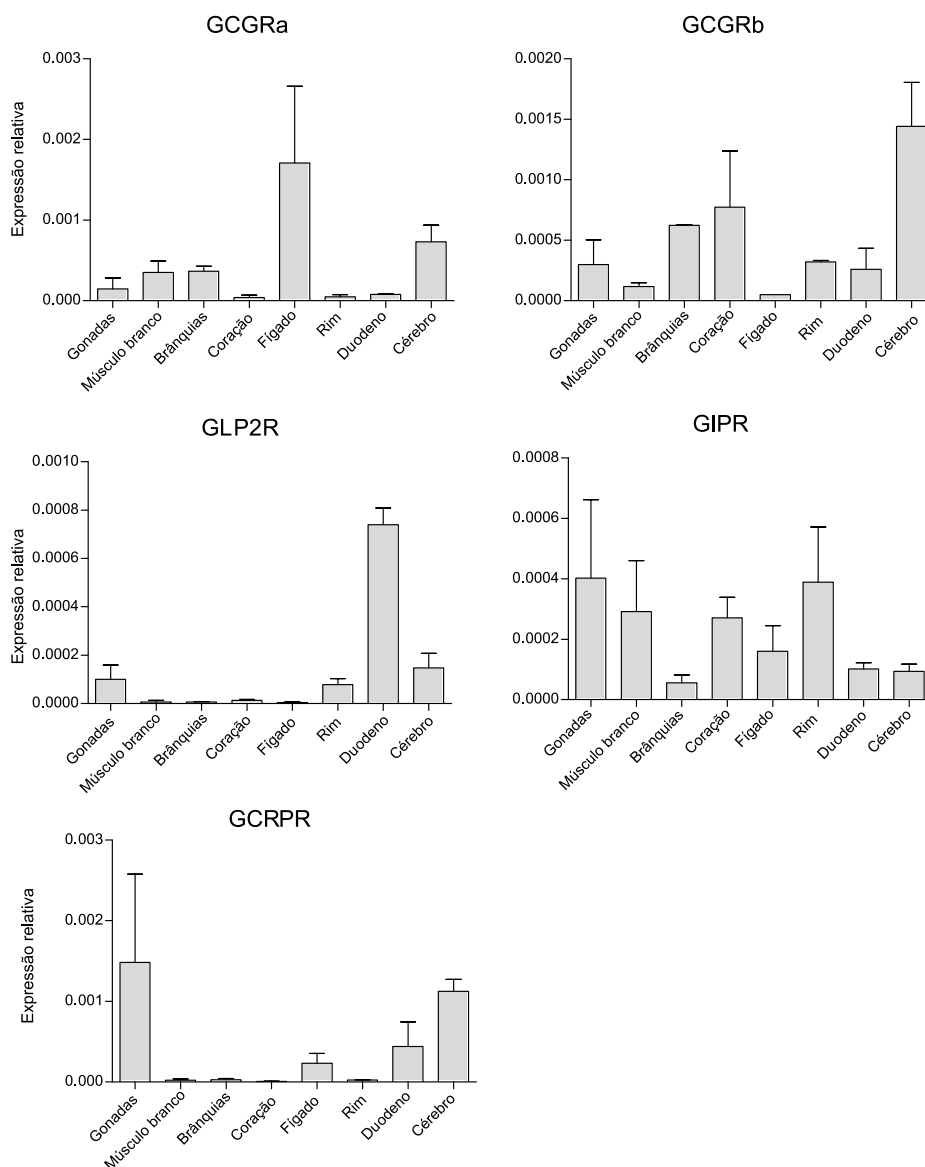
família 2 GPCR e evolutivamente relacionado com os recetores da subfamília do *glucagon* (Figura 21).



**Figura 21.** Esquema representativo da análise de ambiente genómico entre o GCGR/GLP identificados no invertebrado *Ciona* e vertebrados *spotted gar* e humano. Cada um dos genes foi representado no cromossoma a que pertence com uma cor diferente, os genes GCGR, GLP2R, GCGRb e GIPR estão assinalados a vermelho e a laranja representamos GHRHR um recetor que também pertence à família 2 GPCR

#### 4.4 Distribuição tecidual dos diferentes recetores da subfamília do *glucagon* em peixes

Para melhor caracterizar o papel fisiológico dos recetores da família dos GCG/GLPRs e GIPRs em peixes a distribuição tecidual dos cinco recetores identificados em tilápia foi caracterizada em diferentes tecidos por PCR quantitativo (Figura 22). No entanto, para ter uma ideia de qual o padrão de distribuição esperado uma pesquisa sobre a origem dos ESTs foi realizada e verificou-se que estes encontram-se expressos em diferentes tecidos: o GCGR é essencialmente expresso ao nível do rim, fígado e fase embrionária, o GLP1R é expresso tanto no rim como no músculo, no cérebro, no intestino e nas gónadas; o GLP2R é expresso no cérebro, no intestino, no fígado e nos testículos; o GIPR encontra-se expresso em vários tecidos; e o GCRPR não tem ESTs (secção 4.1).



**Figura 22. Distribuição tecidual dos diferentes recetores da subfamília do *glucagon* obtida por PCR quantitativo em tilápia.** A expressão dos cinco recetores foi obtida a partir de cDNA sintetizado de gónadas, músculo branco, brânquias, coração, fígado, rim, duodeno e cérebro. Os valores foram normalizados em relação à expressão do gene de referência 18S.

Em tilápia, de um modo geral, todos os recetores foram amplificados na maioria dos tecidos testados. Os recetores são, na generalidade, relativamente pouco abundantes e apresentam uma distribuição tecidual diferenciada sugerindo que possam ter papéis funcionais diferentes. O GCGRa, GCGRb e GCRPR são relativamente mais expressos do que o recetor para o GIP e para o GLP-2 (**Figura 22**). A expressão do GCGRa foi detetada em maior abundância no fígado e no cérebro, tem uma expressão intermédia no músculo branco, brânquias e gonadas e muito baixa no rim, duodeno e coração. O GCGRb é mais abundante no cérebro e menos expresso no músculo branco e fígado (**Figura 22**).

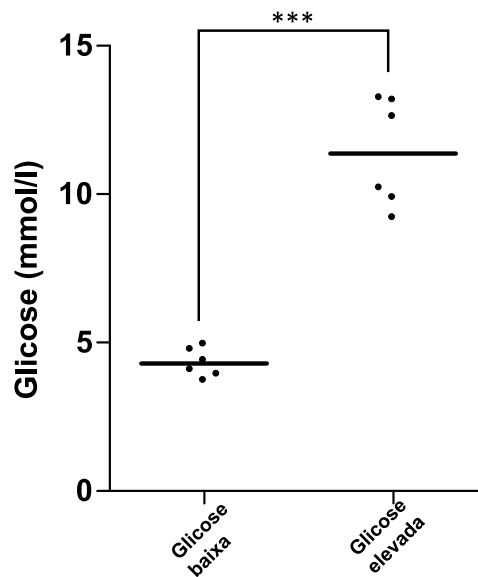
Para a expressão do GCRPR é notória a maior abundância deste recetor no cérebro. Este recetor está também presente no fígado, no duodeno e nas gonadas com uma expressão intermédia e no rim, brânquias e músculo branco e coração apresenta uma expressão muito baixa. O GIPR tem uma distribuição relativamente homogénea em todos os tecidos amostrados, ainda que evidencie uma maior expressão nas gónadas, rim, músculo branco e coração, apresenta uma menor expressão ao nível do fígado, duodeno, cérebro e brânquias. O GLP2R é mais expresso no duodeno, e apresenta-se também expresso no cérebro, rim e gónadas e com uma expressão muito reduzida no coração, fígado, brânquias e músculo branco (**Figura 22**).

#### **4.5 Distribuição dos recetores da subfamília *glucagon* em relação aos níveis de glicose no plasma em peixes**

Para determinar qual a participação dos recetores membros da subfamília do *glucagon* na regulação da glicose no plasma em peixes teleósteos e comparar com o seu papel já descrito em outros vertebrados, a expressão dos recetores foi determinada e comparada entre peixes com diferentes níveis de glicose no plasma. Os tecidos utilizados provieram de peixes que foram submetidos a um jejum até 48h no entanto os dados de glicemia disponíveis indicavam que os elementos sujeitos ao mesmo período de jejum apresentavam valores muito diferentes. Devido ao este facto e de não existirem dados sobre a glicemia inicial os peixes foram agrupados de acordo com os seus níveis de glicémia baixo índice de glicemia (4.3 mmol/l) e altos nível de glicemia (11.4 mmol/l) para verificar potências diferenças de expressão por comparação entre os dois grupos. Os tecidos escolhidos foram o cérebro, o fígado e o duodeno, uma vez que os recetores que provavelmente estão envolvidos na regulação da glicose GCGaR, GCGbR e GIPR têm maior expressão nestes tecidos. Dos animais experimentais foram recolhidos e anotados antes da dissecação dos tecidos, o peso e comprimento.

Dois grupos de peixes (cada um com seis indivíduos) um com níveis baixos de glicose (glicose baixa) e outro com níveis elevados (glicose alta) ( $p < 0.001$ ) foram selecionados a partir de uma experiência previamente realizada no laboratório em robalos (**Figura 23**). O robalo foi escolhido pois de acordo com os dados bibliográficos os seus níveis de glicose são bastante variáveis e podem mudar num curto espaço de tempo, como exemplo no jejum, ao

contrário do que se verifica em tilápia que após alguns dias de jejum ainda apresenta valores de glicose semelhantes aos iniciais (Hsieh et al., 2000, Viegas et al., 2011 e Enes et al., 2011).

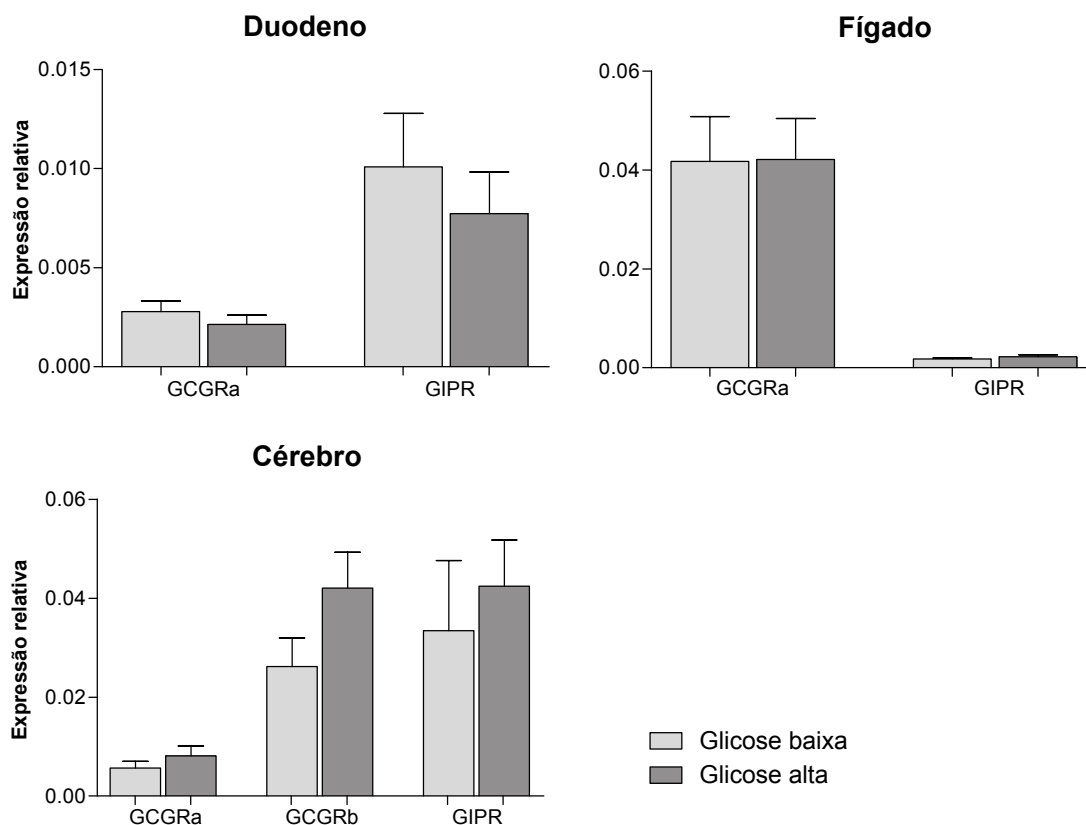


**Figura 23. Gráfico com a variação dos níveis de glicose no plasma dos peixes usados.** O plasma foi retirado de peixes com uma média de tamanho de 20.1+/-0.43 cm e de peso 98.08+/-7.03 g. \*\*\*  $p < 0.001$ . De acordo com a bibliografia os níveis de glicose normal em robalo variam entre 2-3.5 mmol/l aproximando-se dos valores do grupo “glicose baixa”(Del Pozo et al., 2012).

A média dos níveis de glicose no plasma no grupo normal é cerca de 4,29 mmol/l e no grupo com glicose alta é de 11.37 mmol/l (**Figura 23**) e os tecidos escolhidos foram o fígado, o cérebro e o duodeno que são órgãos onde estes recetores são na generalidade mais abundantes e que têm um papel importante no metabolismo da glicose em vertebrados. De acordo com a bibliografia os níveis médios de glicemia em robalo varia entre 2-3.5 mmol/l e desta forma aproximam-se dos valores do grupo de glicose baixa (Del Pozo et al., 2012). A expressão dos recetores GCGR, GLP1R e GIPR foi analisada enquanto que os recetores GLP2R e GCRPR não foram testados. De uma maneira geral todos os recetores foram amplificados e a expressão obtida em robalo é semelhante à de tilápia. Da comparação dos níveis de abundância relativa dos recetores nos dois grupos de peixes verifica-se que não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas dos níveis de expressão em relação aos diferentes níveis de glicose no plasma (**Figura 24**).

No duodeno, o recetor GIPR é o que apresenta maior expressão relativa, o GCGRa tem valores baixos, e os valores de GCGRb são quase indetetáveis. Quando se compara os

grupos em estudo verifica-se que o GCGRa e o GIPR apresentam valores de expressão relativa ligeiramente mais elevados no grupo de baixa glicose. No fígado de robalo, o GCGRa têm uma expressão relativa bastante superior à expressão obtida para o GIPR, e o GCGRb foi indetetável. Os valores do grupo com glicose baixa e glicose alta são muito semelhantes tanto para o GCGRa como para o GIPR. O cDNA de cérebro de robalo apresenta valores de expressão relativa para o GIPR e o GCGRb mais elevados do que para GCGRa e um aumento de glicose no plasma parece aumentar os níveis de expressão de todos os recetores mas parece ser mais notória para o GCGRb em relação ao grupo de glicose baixa, no entanto esta diferença não é estatisticamente significativa e mais replicados serão necessários para validar este resultado (**Figura 24**).



**Figura 24. Distribuição relativa da expressão dos recetores GCGRa, GCGRb e GIPR, em relação aos níveis de glicose no plasma em robalo.** A distribuição dos recetores no duodeno, fígado e cérebro extraídos de dois grupos de robalos (n=6 por grupo) com diferentes níveis de glicose no plasma: baixa glicose (similar ao normal, Del Pozo et al., 2012) e elevada glicose. Os valores foram normalizados em relação à expressão do gene de referência 18S. Análise estatística foi efetuada utilizando o test t student para amostras independentes (*unpaired t test (two-tail)*) bilateral e os gráficos foram obtidos no *GraphPad Software (PRISM)*.

## 5. Discussão

Os recetores que são ativados pelo *glucagon* e pelos péptidos semelhantes ao *glucagon* têm um papel importante na regulação do metabolismo da glicose em mamíferos. Em outros vertebrados os mecanismos que regulam a homeostasia da glicose são pouco conhecidos e o papel do *glucagon* e seus recetores neste processo são na generalidade pouco estudados apesar de evidências de que possam exercer papéis fisiológicos semelhantes. Neste trabalho pretendeu-se caracterizar o sistema homólogo em peixes, caracterizar a sua evolução e determinar qual o seu papel na fisiologia e na regulação da glicose no plasma focando em estudos de expressão dos seus recetores.

### 5.1 Evolução dos recetores e péptidos ligandos do sistema *glucagon* em peixes

O resultado das pesquisas em diferentes bases de dados permitiu a identificação dos genes para os ligandos e recetores da família *glucagon* em peixes e outros vertebrados (**Figura 13 e 16**). Na totalidade a família dos recetores do *glucagon* apresenta 5 genes em peixes mas o número de genes identificados é bastante variável entre espécies, o que sugere que estes sofreram diferentes pressões evolutivas ao longo da radiação dos peixes (**Figura 13**). O GLP2R é o único gene que parece ser identificado regra geral em todas as espécies, tal como o GCGR onde dois genes (GCGRa e GCGRb) duplicados são o resultado de uma duplicação específica no genoma de peixes. Em peixes não existe o homólogo do gene humano GLP1R e o correspondente homólogo GIPR de humano parece apenas existir em algumas espécies (Hwang et al., 2014, Irwin, 2014). Para além disso, um novo gene para um membro desta família, o GCRPR foi também identificado em alguns peixes teleósteos e no celacanto (Park et al., 2013). Sequências dos recetores da família *glucagon* foram também identificados em genomas de peixes ancestrais tal como a lampreia e em invertebrados como o caso da *Ciona* e o anfioxo, o que permite dizer que estes recetores são transversais a muitas espécies e têm uma origem precoce na evolução. A análise filogenética confirma a presença de 5 grupos de recetores distintos, que parecem ter uma origem comum, em que o GLP2R foi o que divergiu mais precocemente na evolução, de seguida o GLP1R e posteriormente o GCGR, GIPR e GCRPR, sendo o GIPR e o GCRPR mais próximos evolutivamente (Irwin et al., 2014) (**Figura 14**). Durante a evolução dos peixes o gene para o GLP1R parece ter sido eliminado, contudo o peptídeo existe e estudo funcionais utilizando ensaios *in vitro* com

células de mamíferos e ativação de vias de sinalização intracelular mostram que o recetor GCGRb é ativado pelo peptídeo GLP-1 de peixes e promove funções semelhantes ao *glucagon* (Musson et al., 2009 e Suzuki et al., 1990). O GIPR também não existe em aves mas o gene para o peptídeo GIP foi identificado, no entanto o recetor ao qual se pode ligar e o seu papel funcional em aves permanece por descobrir sugerindo que o GIP possa interagir com outros recetores da mesma família (Irwin et al., 2014).

No total 5 genes para os peptídeos pertencentes à família das hormonas do *glucagon* foram identificados em peixes e tal como os seus recetores, a sua evolução também foi bastante dinâmica (**Figura 16**). Estes genes dão origem a 7 péptidos maduros cuja função em peixes encontra-se muito pouco estudada. Entre as diferentes espécies de peixes analisadas o número de péptidos é bastante variável visto que em peixes alguns dos genes não foram identificados, mesmo pesquisando tanto o seu genoma como as bases de dados de transcriptomas. A molécula precursora do *proglucagon* é constituída de diferentes formas em vertebrados (Ng et al., 2010). Enquanto que nos mamíferos, aves e reptéis é constituída por uma única sequência que codifica para exões diferentes o GCG, GLP-1 e GLP-2, o que parece sugerir que a origem destes peptídeos resultou de processos de duplicação de um só exão ancestral (Irwin et al., 2011 e Moon et al., 2012). Em peixes teleósteos existem dois genes para o *proglucagon*, talvez devido à duplicação em peixes. O *proglucagon 1* é similar ao dos mamíferos (GCG, GLP-1, GLP-2) e o *proglucagon 2* é mais curto e apenas constituído por GCG e GLP-1. O *proglucagon* em lampreia surge devido a eventos de duplicação independentes e por isso apresenta o *proglucagon I* (GCG, GLP-1, GLP-2) e o *proglucagon II* (GCG, GLP-2) o que sugere a perda específica de um exão GLP-1 (Ng et al., 2010 e Hwang et al., 2014). A análise filogenética do presente estudo é concordante com o anteriormente descrito e três grupos de sequências principais foram identificados e o *proglucagon* e o GCRPR partilham uma origem comum e parecem estar filogeneticamente mais relacionados, o GIP surge num ramo mais à parte e parece ter divergido primeiro (**Figura 17**).

A similaridade entre os péptidos maduros dos membros desta família de peixes com os mamíferos é bastante elevada e estudos funcionais demonstraram que os péptidos podem ter funções semelhantes que foram mantidas ao longo da evolução dos vertebrados (**Figura 18**). O *glucagon* humano tem a capacidade de ativar o GCGR em peixe dourado e em rã devido à similaridade e à conservação de sequências entre os recetores (Musson et al., 2009). Em mamíferos o GLP-1 de peixe ativa o GLP1R em rato e tem a capacidade de estimular a

produção de insulina (Musson et al., 2009). Em mamíferos o GLP-1 e GIP partilham uma elevada identidade (Moon et al., 2012) e isto reflete-se no seu papel funcional, ambas as hormonas têm um papel de incretina. Contudo, em peixes a sequência do GLP-1 parece ser mais semelhante com a sequência do GCG, uma vez que estudos indicam que o GLP-1 de peixes apresenta uma grande afinidade para com o GCGR, uma vez que o GLP-1 tem funções similares ao GCG (Hwang et al., 2014). A sequência do GCRP é bastante conservada entre espécies no entanto o seu papel funcional permanece por descobrir. O GIP ao contrário é o péptido mais divergente entre os mamíferos e os peixes no entanto estudos parecem indicar que o GIP de peixe zebra é capaz de estimular e ativar a sinalização intracelular no GIPR de rato (Musson et al., 2009).

Na realidade, quando se analisa em maior pormenor a evolução do gene GIPR e GIP em peixes verifica-se que este par recetor-hormona bem caracterizado em mamíferos, sofreu pressões seletivas bastantes distintas ao longo da radiação dos peixes, o que em parte pode explicar a sua não identificação neste trabalho no genoma de várias espécies (**Figura 19 e 20**). Nas espécies de peixes onde o gene para o GIPR (peixe zebra, peixe das cavernas, robalo, *spotted gar* e no celacanto) foi identificado, este encontra-se ladeado (ou em *linkage*) por três genes (GPR4, EML2 e CLP3) que também se encontram conservados no em humano (cromossoma 17) (**Figura 19**). Nos genomas de outras espécies caracterizadas, onde o gene para o GIPR está ausente, estes genes em *linkage* com o GIPR também foram encontrados pela mesma ordem ou então foram encontrados em segmentos de cromossomas diferentes o que parece ser indicativo da ocorrência de diferentes pressões seletivas nessa região ao longo da radiação dos peixes teleósteos (Irwin et al., 2014). O gene do peptídeo GIP nas espécies onde foi identificado apresenta genes vizinhos que são mantidos (SNF8 e CALCOCO2) na generalidade de forma conservada no genoma dos peixes onde o GIP parece não existir (**Figura 20**). Durante a evolução o gene para este peptídeo, à semelhança do que aconteceu ao seu recetor, parece ter sido eliminado do genoma de algumas espécies. As consequências fisiológicas da manutenção e/ou eliminação do gene para o recetor e seu péptido ligando em peixes e outros vertebrados permanece ainda por esclarecer.

Para melhor compreender o perfil evolutivo da família dos recetores do *glucagon* e melhor compreender os resultados obtidos pela análise filogenética que sugere que o GLP2R foi um dos primeiros membros desta família a surgir (**Figura 14**), o ambiente genómico dos genes homólogos identificados em *Ciona* (que resultam de uma duplicação em tandem no genoma) foram comparados com as regiões do genoma que contém os genes para os recetores

em vertebrados (**Figura 21**). Da análise resultou a identificação de um gene DDX5 que se encontra muito próximo dos genes para o GCGR-like de *Ciona* no cromossoma 2 e que mapeia também perto do gene para o GLP2R tanto em *spotted gar* LG10 (teleósteos basal que não sofreu o processo de duplicação do genoma que afetou os teleósteos) e em humano no cromossoma 17 o que parece confirmar a ancestralidade do GLP2R (Hwang et al., 2014). Curioso é notar que, tanto em *spotted gar* como em humano, o GLP2R encontra-se no mesmo cromossoma que o GCGR, no entanto no peixe, homologia para o GIPR (cromossoma LG2) foi também identificada mas foi perdida em humano (GIPR em humano mapeia para o cromossoma 19) o que é também indicador das diferentes pressões seletivas que este gene sofreu ao longo do processo evolutivo. Mais ainda, homologia para a região do genoma que contém o GHRHR foi também identificada (**Figura 21**). O GHRHR é também um membro da família 2 ou das secretinas GPCRs e partilha similaridade com os recetores da família do *glucagon* (Siu et al., 2010 e Hwang et al., 2014). Em vertebrados os membros da família dos recetores para o *glucagon* e péptidos semelhantes como o GHRH e membros da sua família surgiram a partir de um gene ancestral comum antes da radiação dos vertebrados e esta similaridade observada no seu ambiente genómico parece indicar que talvez os recetores do *glucagon-like* em *Ciona* possam estar também na base da origem dos GHRH e membros da sua família.

## 5.2 Papel funcional dos recetores da subfamília do *glucagon* em peixes

Para determinar qual o papel funcional dos recetores da família *glucagon* em peixes caracterizou-se a sua expressão em vários tecidos de tilápia e em robalo (**Figura 22 e 24**). A tilápia é um teleósteo herbívoro e consegue utilizar na sua dieta até 50 % de hidratos de carbono (Polakof et al., 2012 e Hsieh et al., 2000) e, no seu genoma, os gene homólogos aos dos mamíferos incluindo o novo recetor GCRPR e péptido ligando foram identificados, o que parece indicar não só que este peixe apresenta um sistema de regulação semelhante ao utilizado pelos mamíferos no controlo da homeostasia da glicose mas também que outros genes desta família possam intervir neste processo. O estudo de expressão tecidual permitiu identificar, por comparação relativa dos níveis de expressão, quais os tecidos onde estes recetores são mais abundantes e aí terem um papel fisiológico mais ativo. A análise de expressão dos recetores foi também caracterizada em robalo. O robalo e a tilápia são peixes evolutivamente próximos no entanto devido aos seus distintos tipos de habitat e de alimentação (o robalo é carnívoro-consome mais proteína e a tilápia é herbívora-consome

mais hidratos de carbono) os seus níveis de regulação de glicose são controlados de maneira distinta e em robalo pode variar num curto espaço de tempo, enquanto que em tilápia pode demorar até 3 semanas mesmo em períodos de jejum (Hsieh et al., 2000, Viegas et al., 2011 e Enes et al., 2011). Daí para analisar a variação dos níveis de glicose no plasma e o papel dos recetores membros da família do *glucagon* o robalo tenha sido escolhido como modelo de estudo em vez de tilápia.

Em tilápia, o GCGRa apresenta uma maior expressão ao nível do fígado, o que também se verifica em robalo e em mamíferos (humano) onde a expressão desse recetor é essencialmente no fígado desempenhando um papel importante nos processos de glicogenólise e gliconeogénese em mamíferos (Kim et al., 2008). A produção do peptídeo GCG em peixes é ao nível dos corpos de *Brockmann*, ilhéus que se encontram dispersos no tecido adiposo localizando-se em redor do ducto biliar, mas este encontra-se armazenado sobretudo no fígado para permitir a disponibilização da glicose (Polakof et al., 2012).

A expressão do recetor GCGRb em tilápia é notoriamente no cérebro e o mesmo acontece em robalo (**Figura 22**).

Em peixes o GCGRb é o duplicado do GCGRa mas, estudos funcionais de ligação aos péptidos revelou que este recetor tem propriedades funcionais idênticas ao GLP1R de tetrápodes e é ativado pelo péptido GLP-1 de peixe (Irwin et al., 2014). Em peixes e outros vertebrados o GLP-1 faz parte do mesmo precursor que o GCG e é também produzido nos corpos de *Brockmann* e foi isolado em peixes, no trato gastrointestinal, fígado e cérebro mas o péptido parece ter como principal órgão de ação o fígado (Polakof, 2012). Em mamíferos o recetor GLP1R encontra-se expresso nas células  $\beta$  do pâncreas onde a sua principal função é a estimulação da secreção de insulina, também ao nível do sistema nervoso central está associado a funções neuro-protetoras e na redução do apetite (Polakof et al., 2011). Em outros vertebrados as funções associadas a este recetor são relativamente bem conservadas mas em peixes parece ter uma função semelhante ao GCGR.

Relativamente ao GLP2R em tilápia este recetor foi significativamente mais expresso no duodeno em comparação com os outros tecidos analisados, mas também foi detetada expressão no cérebro e nas gónadas (**Figura 22**). A abundância da expressão do GLP2R no duodeno de tilápia é consistente com o seu perfil de expressão em humano. Em humano, a função do GLP2 e do seu péptido encontra-se muito pouco estudada comparativamente com os outros membros da família do *glucagon* mas estudos indicam que tanto o péptido GLP2 como o seu recetor encontram-se essencialmente no intestino, o péptido é secretado após a ingestão de alimentos, e também permite a proliferação de células intestinais, e participa na

regulação da capacidade de absorção (Marathe et al., 2013). Embora o papel funcional do péptido GLP-2 em peixes seja pouco conhecido, em truta arco-íris este péptido foi transcrito como parte do gene do *proglucagon* em intestino e cérebro (Irwin et al., 1995). No nosso estudo o recetor GLP2R em tilápia tem uma maior expressão ao nível duodeno e o seu papel funcional foi possivelmente mantido conservado ao longo da evolução.

Em tilápia o GIPR apresentou uma distribuição equilibrada nos tecidos analisados e é dos recetores desta família um dos membros menos expressos (**Figura 22**). Em peixes, o papel do GIPR é pouco conhecido e isto prende-se com ao facto de este recetor estar ausente no genoma da maioria dos peixes o que sugere que a sua importância funcional é relativa de espécie para espécie. O único estudo funcional em peixes em que o sistema GIP foi descrito foi realizado em peixe zebra onde o péptido GIP foi caracterizado e o seu transcrito amplificado no pâncreas e intestino evidenciando a importância deste péptido e do seu recetor no aparelho gastrointestinal (Musson et al., 2009). Em mamíferos este recetor é mais expresso no pâncreas, estômago e tecido adiposo, mas também foi identificado no coração, pulmões e no sistema nervoso central, considera-se estruturalmente semelhante ao GLP1R humano e funcionalmente participam ambos na estimulação da secreção de insulina. Em mamíferos o GIPR também está associado à regulação do metabolismo dos lípidos mas a sua função em tecidos ainda é desconhecida (Yabe et al., 2011, Baggio et al., 2007). Em peixe zebra um aumento do GIP foi detetado em resposta ao jejum e esta resposta fisiológica é antagónica ao que observa em mamíferos (Musson et al., 2009). Estudos de Park et al., 2013 parecem sugerir que o GCRPR é filogeneticamente bastante semelhante como o GIPR e no caso do peixe zebra que apresenta o sistema GIP/GIPR mas não apresenta o GCRP/GCRPR pode indicar que a presença de um pode ditar a ausência de outro. No presente estudo verificou-se que o GIPR em tilápia tem uma expressão muito diversificada o que parece não clarificar a sua função. O novo recetor GCRPR, foi identificado recentemente em peixes tendo por base a identificação de homólogos em tetrápodes tal como a galinha e anfíbio. Em mamíferos este recetor não foi detetado e de acordo com estudos anteriores foi eliminado do genoma dos mamíferos ao longo da evolução (Hwang et al., 2014). Devido à sua recente identificação poucos estudo sobre o seu papel funcional existem e a elevada expressão tecidual no cérebro em relação aos outros tecidos, que também já foi referenciada noutros estudos (Irwin et al., 2011 e Irwin et al., 2014), indica que este recetor poderá estar envolvido na regulação neuroendócrina no cérebro. A sua expressão no duodeno, fígado e gónadas indica outros alvos potenciais para a sua ação que permanecem por descobrir.

Existe uma grande diversidade de espécies de peixes e de acordo com os seus hábitos alimentares eles agrupam em herbívoros, carnívoros e omnívoros. Dependendo do tipo de alimentação os mecanismos envolvidos na regulação da glicose variam e, enquanto há peixes que têm a capacidade de manter níveis constantes de glicose no plasma por longos períodos de jejum e daí serem considerados intolerantes (não regulam a glicose), existem outros em que a variação acontece num curto espaço de tempo (Polakof et al., 2012). A elevada tolerância de alguns peixes a valores de glicose no plasma baixos sugerem uma melhor adaptação destes a longos períodos de privação de comida em relação ao que se verifica nos mamíferos (Polakof et al., 2011). Teste de tolerância à glicose através da injeção de glicose no plasma confirmam a existência de um mecanismo de regulação da glicose em peixes e este parece ser dependente de espécie para espécie e não está relacionado com o tipo de alimentação. Por exemplo, a carpa e a tilápia são dois peixes herbívoros/omnívoros mas enquanto que a tilápia demora 24 h a repor os níveis normais de glicose, em carpa este mecanismo é mais rápido e acontece em menos de cinco horas (**Figura 10**, Polakof et al., 2012). Isto sugere que existem vários outros fatores independentes da alimentação, tais como temperatura da água e o gasto energético que podem influenciar a regulação da glicose em peixes (Polakof et al., 2012).

Em peixes, tal como em outros vertebrados a glicose é essencialmente uma importante fonte de energia para o funcionamento de tecidos como o cérebro, brânquias, eritrócitos e gónadas e, tal como em mamíferos, os membros da família do *glucagon* possuem um papel importante neste processo. Tanto em peixes como em mamíferos o fígado é o órgão central na homeostasia da glicose onde ocorre a metabolização da glicose armazenada (glicogénio) disponibilizando essa forma de energia para o organismo. O *glucagon* tanto em peixes como em mamíferos participa essencialmente disponibilizando a glicose através da gliconeogénese e glicogenólise (Enes et al., 2008) e o seu recetor GCGR é bastante expresso. No entanto, apesar da aparente homologia funcional entre peixes e mamíferos existem péptidos que têm comportamentos diferentes e enquanto que em mamíferos o GLP-1 tem função de incretina e aumenta com o aumento de glicose no plasma, em peixes o GLP-1 tem um comportamento idêntico ao GCG mas estudos utilizando GLP-1 de peixe em ensaios utilizando pâncreas de cão e de rato canulados verificaram que este tem o papel de incretina sugerindo que a diferença do seu papel funcional em peixe está associado ao seu recetor e às diferenças entre o GLP1R de mamífero com o GCGRb de peixe (Musson et al., 2009).

Para melhor caracterizar qual o papel funcional dos recetores da família do *glucagon* na regulação dos níveis de glicose e identificar os recetores “alvo” neste processo em peixes, a expressão dos recetores foi caracterizada em dois grupos de robalos com diferentes níveis de glicose em fígado (órgão central na reposição dos níveis de glicose), duodeno (órgão onde ocorre a absorção de glicose e que transmite ao cérebro a informação sobre a energia consumida) e no cérebro (centro nervoso da regulação hormonal de glicose) (**Figura 24**). O robalo é um peixe carnívoro e a maior parte de glicose do plasma é obtida por vias metabólicas e apenas uma pequena parte resulta da absorção na dieta (Viegas et al., 2011 e Enes et al., 2011). O robalo tal como a tilápia possui os cinco recetores do sistema *glucagon*, o que sugere que os mecanismos envolvidos na sua regulação possam ser semelhantes entre as duas espécies. Os dados de glicemia obtidos do robalo para os peixes amostrados no mesmo período de tempo de jejum apresentavam valores muito disparees o que pode sugerir que os diferentes indivíduos já estariam a regular a glicose mas não de uma maneira sincronizada. Assim sendo e para provar a ideia de que o sistema do glucagon actue no jejum foram agrupados indivíduos de acordo com os níveis de glicemia. No fígado de robalo o grupo com glicose mais elevada e o grupo com glicose mais baixa, não apresentou alterações nos níveis de expressão dos recetores GCGRa e GIPR sugerindo que nenhum destes recetores está envolvido neste processo para o caso experimental testado. O mesmo acontece para duodeno e cérebro onde não se verificaram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos de peixes. Embora o cérebro seja o órgão mais afetado e os níveis de expressão do recetor GCGRb parece acompanhar os níveis de glicose estas diferenças não são estatisticamente significativas (**Figura 24**). O cérebro de peixes, utiliza como fonte de energia corpos cetónicos, lactato, ácidos gordos, aminoácidos mas também glicose e apesar de ter menos reservas de glicogénio do que o fígado (Schmidt e Wegener, 1988, Foster et al., 1993, Plisetskaya et al., 1993), também as utiliza como forma de obtenção de glicose, evitando a necessidade de recorrer à glicose em circulação. Estas reservas revelam-se muito importantes, uma vez que quando os níveis de glicogénio são baixos os peixes podem até mesmo morrer, foi provado que a injeção de glicose no cérebro de peixe provoca alterações no metabolismo dos hidratos de carbono a nível hepático como forma de regular os níveis de glicose (Polakof et al., 2011 e Polakof et al., 2012). Isto sugere que o cérebro é um dos primeiros órgãos a responder e podemos sugerir que a variação dos níveis de GCGRb observados poderá estar associada a este processo de degradação do glicogénio e produção de glicose, o que está de acordo com os dados obtidos para os níveis de GLP1 em truta que sugere ter funções semelhantes ao glucagon (**Figura 11**, Polakof et al., 2012) No futuro outros testes usando

indivíduos com discrepâncias mais acentuadas dos níveis de glicose no plasma, recorrendo a experiências com monitorização dos níveis de glicose, glicogénio num estado inicial e após o jejum poderá clarificar melhor qual a intervenção dos receptores da família *glucagon* no metabolismo da glicose. Em alternativa pode também recorrer-se a um teste de tolerância de glicose para obter resultados mais fidedignos do envolvimento e importância do GCGRb e outros recetores na regulação da glicose em peixes. Outro aspeto importante, seria a comparação da expressão do péptido e do receptor nos diferentes tecidos.

## 6. Conclusões

Neste trabalho genes homólogos para os recetores que ligam ao *glucagon* e péptidos semelhantes em mamíferos foram isolados e caracterizados em peixes bem como os seus potenciais péptidos ativadores. Os recetores e ligandos da família do *glucagon* surgiram cedo no processo evolutivo e foram encontrados desde o genoma do peixe ancestral a lampreia, bem como nos genomas de *Ciona* e do anfioxo (invertebrados). Entre peixes o número de genes identificados é bastante variável. No total, cinco recetores foram isolados e estes evoluíram de maneira distinta dos genes homólogos em humano. Duplicados para o GCGR foram identificados em todos os peixes teleósteos (à exceção da *spotted gar* e *celacanto*) e o GIPR apenas foi identificado em algumas espécies sugerindo que a manutenção deste recetor em peixes foi dependente de espécie para espécie, e as consequências funcionais da presença e ausência do GIPR e GIP em peixes permanecem por descobrir. O GCRPR é o novo recetor desta família e foi identificado em alguns peixes teleósteos e no celacanto, não se encontra em mamíferos, mas existe em aves e, tal como o GIPR, o gene para este recetor parece não existir em alguns peixes.

A análise filogenética sugere que os recetores e péptidos sofreram diferentes pressões evolutivas e isto afetou a evolução dos pares hormona-recetor. O GLP2R foi o primeiro recetor a emergir, o que se confirma quando se compara com o genoma de *Ciona* que contém dois recetores GCGR-like e se identificam genes em *linkage* com o GLP2R, enquanto que nos péptidos a evolução do GIP foi distinta dos outros membros e o GCRP emergiu do mesmo ancestral que o *proglucagon* que contém os péptidos GCG, GLP-1 e GLP-2.

A distribuição tecidual dos recetores em tilápia sugere que estes têm uma abundância e distribuição distintas e possivelmente têm diferentes papéis funcionais que poderão ser em parte semelhante aos mamíferos: o GCGRa é mais abundante no fígado, o GCGRb no cérebro e o GLP2R no duodeno. Em tilápia um o GIPR seja notoriamente mais expresso não foi identificado o que sugere um papel pouco específico e GCRPR foi encontrado no cérebro, duodeno, fígado e gónadas mas a sua função em peixes permanece ainda por descobrir. Comparação da expressão relativa dos recetores entre dois grupos de robalos com diferentes níveis de glicose no plasma não permitiu identificar os recetores envolvidos neste processo embora o cérebro seja o tecido mais afetado. A importância relativa deste sistema na homeostasia da glicose em peixes, permanece ainda por desvendar e outros estudos necessitam de ser realizados para melhor caracterizar a sua função em peixes.

## 7. Bibliografia

Abascal F, Zardoya R, Posada D, 2005. Prot-Test: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21(9): 2104-2105.

Anand BK, Chhina GS, Sharne KN, Dua S, Singh B, 1964. Activity of single neurons in the hypothalamus feeding centers: effect of glucose. *Am J Physiol* 207: 1146-1154.

Baggio LL, Drucker DJ, 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132: 2131-2157.

Baldassano S, Bellanca AL, Serio R, Mule F, 2012. Food intake in lean and obese mice after peripheral administration of glucagon-like peptide 2. *J Endocrinol* 213: 277-84.

Bano G, 2013. Glucose homeostasis, obesity and diabetes. *Best Practice & Research Clinical obstetrics and Gynaecology* 27: 715-726.

Barma P, Dey D, Basu D, Roy SS, Bhattacharya S, 2006. Nutritionally induced insulin resistance in an Indian Perch: a possible model for type 2 diabetes. *Curr Sci* 90: 188-194.

Burcellin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B, 2001. Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50: 1720-28.

Cardoso JC, 2003. The family 2 of G-protein coupled receptors (GPCRs) in two marine teleosts, *Fugu rubripes* and *Sparus aurata*; Tese de doutoramento.

Cardoso JC, Clark MS, Vieira FA, Bridge PD, Gilles A e Power DM, 2005. The secretin G-protein coupled receptor family; teleost receptors. *J Mol Endocrinol* 34: 753-765.

Cardoso JC, Pinto V, Vieira F, Clark M, Power DM. 2006. Evolution of secretin family GPCR members in the Metazoa. *BMC Evol Biol* 6:108 doi:10.1186/1471-2148-6-108

Chow BK, Moon TW, Hoo RL, Yeung CM, Müller M, Christos PJ e Mojsov S, 2004. Identification and characterization of a glucagon receptor from the goldfish *Carassius auratus*: implications for the evolution of the ligand specificity of glucagon receptors in vertebrates. *Endocrinology* 145: 3273-3288.

Conde-Sieira M, Aguilar AJ, Lopez-Patiño MA, Miguez JM, Soengas JL, 2010. Stress alters food intake and glucosensing response in hypothalamus, hindbrain, liver, and Brockmann bodies of rainbow trout. *Physiol Behav* 101: 483-493.

- Connors TJ, Schneider MJ, Genoway RG, Barraclough SA, 1978. Effects of acclimation temperature on plasma levels of glucose and lactate in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Exp Zool* 206: 443-449.
- DeAlmeida VI, Mayo KE, 1998. Identification of binding domains of the growth hormone-releasing hormone receptor by analysis of mutant and chimeric receptor proteins. *Mol Endocrinol* 12: 750-765.
- Deacon CF, 2005. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? *Regul Pept* 128: 117-124.
- Del Pozo A, Montoya A, Vera LM, Sánchez-Vásquez FJ, 2012. Daily rhythms of clock gene expression, glycaemia and digestive physiology in diurnal/nocturnal European seabass. *Physiol Behav* 106 (4): 446-50.
- Drucker DJ, 2005. Biologic actions and therapeutic potential of the proglucagon-derived peptides. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 1: 22-33.
- Drucker DJ, 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3: 153-165.
- Emdin SO, 1982. Effects of hagfish insulin in the atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. The *in vivo* metabolism of <sup>14</sup>Cglucose and <sup>14</sup>Cleucine and studies on starvation and glucose-loading. *Gen Comp Endocrinol* 47: 414-425.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A., 2008. *Fish Physiology and Biochemistry* 35(3): 519-539.
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A, 2011. Dietary Carbohydrate utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax L.*) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata L.*) Juveniles. *Fisheries Science* 19(3): 201-215.
- Epple A, Brinn JE, Burggren W, Ishii S, Langer H, Neuweiler G, Randall DJ, 1987. The comparative physiology of the pancreatic islets. *Springer-Verlag* vol 21.
- Felsenstein J, 1985. Phylogenies and the comparative Method. *The American Naturalist* 125: 1-15.
- Foster GD, Youson JH, Moon TW, 1993. Carbohydrate metabolism in the brain of the adult lamprey. *J Exp Zool* 267: 27-32.
- Gallwitz B, 2011. Glucagon-like Peptide-1 Analogues for Type 2 Diabetes Mellitus. Current and Emerging agents. *Drugs* 71(13): 1675-1688.
- Giugliano OD, Ceriello A, Esposito K, 2008. Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am J Clin Nutr* 87: 217S-222S.
- Habegger KM, Heppner KM, Geary N, Bartness TJ, DiMarchi R, Tschöp H, 2010. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nat Rev Endocrinol* 6(12): 689-697.

Hemre GI, Mommsen, TP, Krogdahl A, 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* 8: 175-194.

Holmes DJ, Fluckiger R, Austad SN, 2001. Comparative biology of ageing in birds: an update. *Exp Gerontol* 36: 869-883.

Hoyt EC, Lund PK, Winesett DE, Fuller CR, Ghatei MA, Bloom SR, Ulshen MH. 1996. Effects of fasting, refeeding, and intraluminal triglyceride on proglucagon expression in jejunum and ileum. *Diabetes*. 45: 434-9.

Hornby PJ, Moore BA. 2011. The therapeutic potential of targeting the glucagon-like peptide-2 receptor in gastrointestinal disease. *Expert Opin Ther Targets* 15: 637-46.

Hsieh SL, Shiau SY, 2000. Effects of diets containing different carbohydrates on starved condition in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Fisheries Science* 66(1): 32-37.

Hwang J, Yun S, Moon M, Park C, Seong J, 2014. Molecular evolutions of GPCRS GLP1/GLP1 receptors. *Journal of Molecular Endocrinology* 52, T15-T27.

Irwin DM e Wong J, 1995. Trout and chicken proglucagon: alternative splicing generates mRNA transcripts encoding glucagon-like peptide 2. *Mol Endocrinol* 9: 267-277.

Irwin D, Huner O, Youson J, 1999. Lamprey Proglucagon and the origin of Glucagon-like Peptides. *Mol Bio Evol* 16 (11): 1548-1557.

Irwin, DM, Wong K, 2005. Evolution of New Hormone Function: Loss and Gain of a Receptor. *Jornal of Heredity* 96(3): 205-211.

Irwin DM, 2009. Molecular evolution of mammalian incretin hormone genes. *Regul pept* 155: 121-130.

Irwin DM, Prentice KJ, 2011. Incretin hormones and the expanding families of glucagon-like sequences and their receptors. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13(suppl.1): 69-81.

Irwin DM, 2014. Evolution of receptors for peptides similar to glucagon. *General and Comparative Endocrinology* (Gen Comp Endocrinol. 2014 Mar 17. pii: S0016-6480(14)00074-4. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.03.002).

Jones DT, Taylor WR, Thornton JM, 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8(3): 275-282.

Jordan SD, Könnner C, Brüning JC, 2010. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 67: 3255-3273.

Laburthe M, Couvineau A, Marie JC, 2002. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels* 8: 137-153.

Katritch V, Cherezov V, Steven RC, 2012. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends in Pharmacological Sciences* 33: 17-27.

Kim S, Nian C, Karunakaran S, Clee SM, Isales M, McIntosh CHS, 2012. GIP-Overexpressing Mice Demonstrate Reduced Diet- Induced Obesity and Steatosis, and Improved Glucose Homeostasis. *PLoS ONE* 7(7) e40156: 1-14.

Kim W, Egan JM, 2008. The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacol Rev* 60 (4): 470-512.

Kobilka BK, 2007. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 794-805.

Madsbad S, 2014. The role of glucagon-like peptide-1 impairment in obesity and potential therapeutic implications. *Diabetes, Obes Metab* 16: 9-21.

Maggs D, Macdonald I e Nauck MA, 2008. Glucose homeostasis and the gastrointestinal tract: insights into the treatment of diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10: 18-33.

Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, Horowitz, M. 2013. Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: A review. *Peptides* 4: 75-86.

Meier JJ, Nauck MA, Schmidt WE, Gallwitz B, 2002. Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited. *Regul Pept* 107: 1-13.

Meier JJ, Nauck MA, Poot A, Heinze K, Goetze O, Bulut K, Schmidt W, Gallwitz B, Holst J, 2006. Glucagon-like peptide 2 stimulates glucagon secretion, enhances lipid absorption, and inhibits gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology*. 130: 44-54.

Mirabeau O, Joly J, 2013. Molecular evolution of peptidergic signalling systems in bilaterians. *PNAS* 110 (22): E2028-E2037.

Mommsen TP, Plisetskaya EM, 1991. Insulin in fishes and agnathans: history, structure, and metabolic regulation. *Rev Aquat Sci* 4:225-259.

Moon MJ, Park S, Kim D, Cho EB, Hwang J, Vaudry H, Seong JY, 2012. Structural and Molecular Conservation of Glucagon-like Peptide-1 and its Receptor Confers Selective Ligand-Receptor Interaction. *Front Endocrinol* 3: 141.

Moon TW, 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem Mol Biol* 129: 243-249.

Musson MC, Jepeal LI, Mabray PD, Zhdanova IV, Cardoso WV, Wolfe MM, 2009. Expression of glucose-dependent insulintropic polypeptide in the Zebrafish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1803-R1812.

Musson M, Jepeal L, Finnerty J, Wolfe M, 2011. Evolutionary expression of glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP). *Regulatory peptides* 171: 26-34.

Ng SYL, Lee LTO, Chow BKC, 2010. Insights into the evolution of proglucagon-derived peptides and receptors in fish and amphibians. *Ann N Y Acad Sci* 1200: 15-32.

Oh SH, Darwiche H, Cho JH, Shupe T, Petersen BE, 2012. Characterization of a novel functional protein in the pancreatic islet: IHoP regulation of glucagon synthesis in alpha-cells. *Pancreas* 41(1): 22-30.

Pal K, Melcher K, Xu HE, 2012. Structure and mechanism for recognition of peptide hormones by class B G protein-coupled receptor. *Acta Pharmacologica Sinica* 33:300-311.

Park C, Moon M, Park S, Kim D, Cho E, Millar R, Hwang J, Seong J, 2013. A Novel Glucagon- Related Peptide (GCRP) and Its Receptor GCRPR Account for Coevolution of Their Family Members in Vertebrates. *PLoS One* 8(6): e65420.

Plisetskaya EM, Duguay S, Schrgibman MP, Scanes CE, Pang P, 1993. Pancreatic hormones and metabolism in ectotherm vertebrates: current views. *Academic Press*, New York 266-287.

Plisetskaya EM, Duan C, 1994. Insulin and insulin-like growth factor I in coho salmon *Oncorhynchus Kisutch* injected with streptozotocin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 267: R1408-R1412.

Plisetskaya EM, Mommsen TP, 1996. Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. *Int Rev Cytol* 168: 187-257.

Polakof S, Arjona FJ, Sangiao-Alvarellos S, Martin del Río MP, Mancera JM, Soengas JL, 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J Comp Physiol B-Biochem Syst Environ Physiol* 176: 441-452.

Polakof S, Ceinos, RM, Fernández-Durán B, Miguez JM, Soengas JL, 2007. Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 265-273.

Polakof S, Panserat S, Plagnes-Juan E, Soengas JL, 2008. Altered dietary carbohydrates significantly affect gene expression of the major glucosensing components in Brockmann bodies and hypothalamus of rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R1077-R1088.

Polakof S, Miguez JM, Soengas JL, 2011a. Evidence for a gut-brain axis used by glucagon-like peptide-1 to elicit hyperglycaemia in fish. *J Neuroendocrinol* 23: 508-518.

Polakof S, Mommsen TP, Soengas JL, 2011. Glucosensing and Glucose Homeostasis: From fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 160: 123-149.

Polakof S, Panserat S, Soengas J, Moon TW, 2012. Glucose metabolism in fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 182(8): 1015-45.

Puviani AC, Ottolenghi C, Gavioli ME, Fabbri E, Brighenti L, 1990. Action of glucagon and glucagon-like peptide on glycogen metabolism of trout isolated hepatocytes. *Comp Biochem Physiol* 96B: 387-391.

Ronner P, Scarpa A, 1987. Secretagogues for pancreatic hormone release in the channel catfish. *Gen Comp Endocrinol* 65: 354-362.

Rosenfeld L, 2002. Insulin: Discovery and Controversy. *Clinical Chemistry* 48(12): 2270-2288.

Salehi M, Aulinger BA, D'Alessio DA, 2008. Targeting  $\beta$ -cell mass in type 2 diabetes: Promise and limitations of new drugs based on incretins. *Endocr Rev* 29: 367-379.

Schmidt H, Wegener G, 1988. Glycogen phosphorylase in fish brain (*Carassius carassius*) during hypoxia. *Biochem Soc Trans* 16: 621-622.

Schmidt PT, Naslund E, Gryback P, Jacobsson H, Hartmann B, Holst JJ, Hellström PM, 2003. Peripheral administration of GLP-2 to humans has no effect on gastric emptying or satiety. *Regul Pept* 116: 21-5.

Siu FY, Stevens RC, 2010. RAM-ing up classe b GPCR ECD structural coverage. *Structure* 18(9): 1067-1068.

Soengas JL, Fuentes J, Otero J, Andrés MD, Aldegunde M, 1992. Seasonal changes in carbohydrate metabolism in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their relationship to changes in gill ( $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$ ) - ATPase activity. *Aquaculture* 108: 369-380.

Soengas J L, Aldegunde M, 2004. Brain glucose and insulin: effects on food intake and brain biogenic amines of rainbow trout. *J Comp Physiol A* 190: 641-649.

Soengas JL, Polakof S, Chen X, Sangiao-Alvarellos S, Moon TW, 2006. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes with food deprivation and refeeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R810-R821.

Suzuki S, Kawai K, Ohashi S, Mukai H, Murayama Y, Yamashita K, 1990. Reduced insulinotropic effects of glucagon like peptide I- (7-36)-amide and gastric inhibitory polypeptide in isolated perfused diabetic rat pancreas. *Diabetes* 39: 1320-1325.

Thorpe A, Ince BW, 1976. Plasma insulin levels in teleost determined by a charcoal-separation radioimmunoassay technique. *Gen Comp Endocrinol* 30: 332-339.

Tsai CH, Hill M, Asa SL, Brubaker PL, Drucker DJ, 1997. Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am J Physiol* 273: E77-84.

Viegas I, Mendes V, Leston S, Jarak I, Carvalho R, Pardal M, Manadas B, Jones J, 2011. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 160: 341-347.

Woods SC, Lutz TA, Geary N, Langhans W, 2006. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Phil Trans R Soc B* 361: 1219-1235.

Yabe D, Seino Y, 2011. Two incretin hormones GLP-1 and GIP: Comparison of their actions in insulin secretion and  $\beta$  cell preservation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107: 248-256.

Yeo R, Sawdon M, 2013. Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 14(7): 296-300.

Zhou L, Irwin D, 2004. Fish proglucagon genes have differing coding potential. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 137: 255-264.

Zhou J, Livak MF, Bernier M, Muller DC, Carlson OD, Elahi D, Maudsley S, Egan JM, 2007. Ubiquitination is involved in glucose-mediated downregulation of GIP receptor in islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E538-547.

Zunz E e La Barre J, 1929. Contributions a l'étude des variations physiologiques de la secretion interne du pâncreas relations entre les secretions externe et interne du pancreas. *Arch Int Physiol Biochim* 31: 20-44.

## **8. Anexos**

**Tabela anexo 1. Tabela com números de acesso da subfamília dos recetores glucagon em diferentes espécies.**

Espécies	Abr	GCCR	GLPIR	GLP2R	GIPR	GCRPR	GCGR-like	N total
<i>Homo sapiens</i>	Hsa	AAH3628.1	AAH13494.1	AAH96263.1	AAAC97984.1	n.i	n.i	4
<i>Mus musculus</i>	Mmu	AAH57988.1	O35659	NP_783612.2	NP_001074284.1	n.i	n.i	4
<i>Gallus gallus</i>	Gga	ENSGALG00000011219	NP_001129023.1	NP_001156720.1	n.i	ACH90400.1	n.i	4
<i>Anolis carolinensis</i>	Aca	XP_003217372.1	ENSACAG00000001843	ENSACAG000000016945	ENSACAG00000009350	ENSACAG00000001229	n.i	5
<i>Pelecanus sinensis</i>	Psi	n.i	ENSXETG00000004863	ENSXETG000000018008	ENSXETG00000009150	ENSXETG000000017703	n.i	4
<i>Xenopus tropicalis</i>	Xtr	XP_002937359.2	ENSXETG000000032385	ENSXETG000000016321	XP_002932679.2	ENSXETG000000010322	n.i	5
<i>Laimneria chalumnae</i>	Lch	ENSLACG000000014981	ENSLACG000000014381	ENSLACG00000003010	ENSLACG000000007720	ENSLACG000000003192	n.i	5
<i>Tadifugu rubripes</i>	Tru	XP_003964779.1	n.i	ENSTRU000000017202	n.i	ENSTRU000000015257	n.i	4
<i>Oreochromis niloticus</i>	Omi	ENSONIG00000001985	n.i	ENSONIG000000019565	XP_003459508.1	XP_003438650.1	n.i	5
<i>Maylandia zebra</i>	Mze	XP_004559575.1	n.i	XP_004569770.1	XP_00456971.1	XP_004562571.1	n.i	5
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Xma	ENSXMAG00000012984	n.i	ENSXMAG00000005305	n.i	n.i	n.i	3
<i>Oryzias latipes</i>	Ola	XP_004071681.1/ ENSORLG00000007082	n.i	ENSORLG00000013155	n.i	ENSORLG00000007568	n.i	4
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gac	ENSGACG00000010535	n.i	ENSGACG00000014797	n.i	ENSGACG00000009099	n.i	4
<i>Danio rerio</i>	Dre	ENSDARG000000070973	n.i	ENSDARG000000078548	ENSDARG000000025478	n.i	n.i	4
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tni	ENSTNIG00000010439	n.i	n.i	n.i	ENSTNIG00000012820	n.i	3
<i>Gadus morhua</i>	Gmo	ENSGMORG00000008208	n.i	n.i	n.i	ENSGMORG00000006250	n.i	3
<i>Carassius auratus</i>	Cau	AA593685.1	n.i	n.i	n.i	n.i	n.i	2
<i>Sparus auratus</i>	Sau	AAW82330.1	n.i	n.i	Isolado no laboratório CCMar	n.i	n.i	1
<i>Aspynax mexicanus</i>	Ame	ENSAMXG00000017308	n.i	ENSAMXG000000016128	ENSAMXG000000010353	n.i	n.i	4
<i>Salmo salar</i>	Ssa	n.i	n.i	n.i	n.i	n.i	n.i	0
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Dla	DLAgn_00191040glucagon DLAgn_00178590GIPprof533	n.i	DLAgn_00240050GIP2R	DLAgn_00036000GIPrpro446	DLAgn_00100590GCGRpro423	n.i	5
<i>Anguilla anguilla</i>	Aan	comp184802a24575 Aan_scaffold4430	n.i	Aan_scaffold221	comp233489b255846a	n.i	n.i	4
<i>Anguilla japonica</i>	Aja	Aja_scaffold162 Aja_scaffold5045	n.i	Aja_scaffold71	Aja_scaffold5094	n.i	n.i	4
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Loc	ENSLLOC000000013910	n.i	ENSLLOC000000011822	ENSLLOC000000014786	ENSLLOC000000003380	n.i	4
<i>Callorhynchus milii</i>	Cmi	SINCAMG00000002895	n.i	SINCAMG00000004406	n.i	n.i	n.i	3
<i>Petromyzus marinus</i>	Pma	ENSPMAG00000003562	n.i	ENSPMAG00000003877	n.i	ENSPMAG000000008188	n.i	2
<i>Ciona intestinalis</i>	Cin	n.i	n.i	n.i	n.i	n.i	ENSCING000000006559 ENSCING000000006557	2
<i>Branchiostoma floridae</i>	Bfl	n.i	n.i	n.i	n.i	n.i	gw.98.115.1 gw.98.147.1	2

Tabela anexo 2. Tabela com os Ests dos recetores da família *glucagon* pesquisados em diferentes espécies.

Espécie	Receptores	N.º acesso EST	Tecidos
<i>Ictalurus punctatus</i>	GLP1R	FD345136.1,FD345137.1	Fígado, pituitária, ovário e testículos
<i>Oryzias latipes</i>	GCGR	BJ712054.1,BJ904474.1,BJ723417.1 BJ916846.1,BJ915098.1,BJ902754.1,AM328279.1	Todo o embrião e fígado do adulto
<i>Danio rerio</i>	GCGR	CR928118.1,EB775034.1	Todo o embrião, embrião dia 2 e 3
<i>Pimephales promelas</i>	GLP2R	DT276320.1,DT312762.1,DT312761.1	Testículos
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	GCGR	DW644271.1, DW644270.1	Larva
<i>Osmerus mordax</i>	GIPR	EL550293.1	Vários tecidos
<i>Cyprinus carpio</i>	GCGR	CF662316.2	Fígado
	GLP1R	CF662957.2	Músculo-esquelético branco, músculo cardíaco, rim, cérebro, brânquias, mucosa intestinal
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	GLP2R	GT222849.1	Brânquias, intestino e fígado
<i>Haplochromis burtoni</i>	GLP2R	CN470740.1	Cérebro
<i>Ictalurus furcatus</i>	GCGR	FD219376.1,FD255905.1, FD069311.1., FD211357.1	Cabeça do rim, fígado, baço, brânquias, pele e intestino, estômago, músculo, tecido do olfato, e tronco do rim
<i>Dissostichus mawsoni</i>	GCGR	FE207492.1,FE208163.1	Cabeça do rim, fígado, baço, brânquias, pele e intestino
			Cabeça do rim

**Tabela anexo 3. Percentagens de identidade e similaridade da sequência completa de proteína deduzida dos recetores da subfamília do *glucagon* em Tilápia.**

	<b>GCGRb</b>	<b>GLP2R</b>	<b>GIPR</b>	<b>GCRPR</b>
<b>GCGRa</b>	54 68	31 47	43 55	33 47
<b>GCGRb</b>	100	33 50	42 54	33 47
<b>GLP2R</b>		100	31 47	29 43
<b>GIPR</b>			100	35 50

Tabela anexo 4. Tabela com números de acesso dos péptidos da família glucagon.

Espécies	Abr	Pro-GCG		Percursor GIP	GCRP
<i>Homo sapiens</i>	Hsa	AAH05278.1		AAH96149.1	n.i
<i>Mus musculus</i>	Mmu	AAH12975.1		EDL16005.1	n.i
<i>Gallus gallus</i>	Gga	ENSGALG00000011104		ABL10366.1	JH375139.1
<i>Anolis carolinensis</i>	Aca	ENSACAG00000014182		n.i	GL343063.1
<i>Pelodiscus sinensis</i>	Psi	ENSPSIG00000010712		XP_006120513.1	n.i
<i>Xenopus tropicalis</i>	Xtr	ENSXETG000000013178		NP_001090751.1	GL172703.1
<i>Latimeria chalumnae</i>	Lch	XP_006004407.1		n.i	JH126563.1
		<b>Pro-GCG 1</b>	<b>Pro-GCG 2</b>		
<i>Takifugu rubripes</i>	Tru	ENSTRUG00000008721	ENSTRUG00000004633	n.i	scaffold_66
<i>Oreochromis niloticus</i>	Oni	ENSONIG00000018307	ENSONIG00000008919	Scaffold GL831200.1	GL831196.1
<i>Maylandia zebra</i>	Mze	XP_004570484.1	XP_004557704.1	n.i	n.i
<i>Xiphophorus maculatus</i>	Xma	ENSXMAG00000013819	ENSXMAG00000011481	n.i	n.i
<i>Oryzias latipes</i>	Ola	ENSORLG00000002782	ENSORLG00000016891	n.i	scaffold169
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gac	ENSGACG00000013877	ENSGACG00000005606	n.i	Gac_scaffold_6
<i>Danio rerio</i>	Dre	ENSDARG00000079296	ENSDARG00000040907	AAI46706.1	n.i
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tni	ENSTNIG00000013278	ENSTNIG00000000614	n.i	Tni_9_3345365-3349442
<i>Gadus morhua</i>	Gmo	ENSGMOG00000003985	ENSGMOG00000014909	n.i	Gmo_scaffold03564
<i>Carassius auratus</i>	Cau	P79695.1	n.i	n.i	n.i
<i>Sparus auratus</i>	Sau	n.i	n.i	n.i	n.i
<i>Astyanax mexicanus</i>	Ame	ENSAMXG000000013524	ENSAMXG00000010007	ENSAMXG000000008541	n.i
<i>Salmo salar</i>	Ssa	SS2U042201	SS2U025187	ABW77503.1/SS2U042706	n.i
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Dla	n.i	n.i	n.i	n.i
<i>Anguilla anguilla</i>	Aan	n.i	n.i	n.i	n.i
<i>Anguilla japonica</i>	Aja	n.i	n.i	n.i	n.i
<i>Lepisosteus oculatus</i>	Loc	ENSLOCG00000008502		n.i	scaffold.LG4_16_6
<i>Callorhynchus milii</i>	Cmi	SINAMG00000000174		SINAMG000000003496	n.i
<i>Petromyzus marinus</i>	Pma	ENSPMAG00000002186 (Progcg I)	ENSPMAG00000005961 (Progcg II)	n.i	n.i
<i>Ciona intestinalis</i>	Cin	n.i	n.i	n.i	n.i
<i>Branchiostoma floridae</i>	Bfl	n.i	n.i	n.i	n.i

**Tabela anexo 5. Tabela com os ESTs dos péptidos ligados da família *glucagon* pesquisados.**

<b>Espécie</b>	<b>Ligandos</b>	<b>N.º Acesso EST</b>	<b>Tecidos</b>
<i>Ictalurus punctatus</i>	GCG isoforma 2	GH466507.1, FD017945.1, CK424102.1, CK421825.1	Estômago, músculo, e tecido do olfato e tronco do rim, estômago e baço
<i>Oryzias latipes</i>	Progegl1	AM152158.1	Néurula
	Progegl2	DK207061.1, DK225601.1, DK175506.1, DK152415.1	Ovário e animal completo
<i>Danio rerio</i>	Progegl1	CN174904.1, EH549130.1, EH471300.1, EH445427.1, EH570252.1	Fígado, ovário, cérebro, incluindo tecidos e cartilagens à volta do cérebro
	Progegl2	EH526688.1, EH500456.1, AL915871.1	intestino, órgãos internos, embrião
	GCCa	B984460.1	Ovário
	GCG isoforma 2	EH530712.1, EB859702.1, EH504531.1, EH600219.1, EH582803.1, EE716946.1, CO356060.1.1	intestino, órgãos internos, dia 1 do embrião, embrião, animal completo, testículos
<i>Pimephales promelas</i>	Gip	CO798689.1	Fígado
	Progegl1	DT154213.1, DT154214.1	Animal inteiro
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	GCG isoforma 2	DT103570.1	Animal adulto inteiro
	GCG isoforma2	GW812055.1	Branquias, intestino, fígado
<i>Ictalurus furcatus</i>	Progegl2	FD090217.1, FD090216.1	Estômago, músculo, tecido do olfato, tronco do rim
<i>Nothobranchius furzeri</i>	Progegl1	JZ27992.1, JZ245968.1, JZ31838.1, JZ31839.1	Animal inteiro
	Progegl2	JZ328523.1, JZ328522.1, JZ257200.1, JZ257199.1, JZ286435.1, JZ286434.1, JZ305081.1, JZ305080.1, JZ325136.1, JZ244773.1, JZ244772.1, JZ329280.1, JZ329279.1, JZ325137.1, JZ297392.1, JZ236366.1, JZ297391.1, JZ236365.1	Animal inteiro
	GIP	GR702825.1	Testículos
	Progegl2	GR626327.1, JK511624.1, GR638739.1, GR630946.1, GR598104.1, GR624779.1, GR630001.1	Fase juvenil, gónadas, larva, retina
<i>Lates calcarifer</i>	Progegl1	JG740300.1	Rim, baço, cérebro, músculo, olho, fígado, brânquias, intestino e coração
<i>Salmo salar</i>	Progegl1	CA042823.1	Intestino
	Progegl2	CB504583.1, DW533430.1	Intestino
	GIP	GO048864.1, GO048863.1, EG844117.1, EG844116.1	Cérebro, rim, baço, tiróide
<i>Cymoglossus semilaevis</i>	GCG isoforma 2	GH231578.1	Cabeça do rim, fígado, intestino e baço
	Progegl1	EX179221.1, EX177935.1, FF415934.1, EX740423.1, EX739340.1, EX177806.1	Intestino
<i>Gadus morhua</i>	Progegl2	EX739138.1	Intestino
	Progegl1	BX306296.3, BX306295.3	Tecido adiposo, sangue, cérebro, diferenciação das gónadas, brânquias, intestino, rim, fígado, músculo, ovário, pituitária, testículos
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Progegl2	CX149421.1, BX886170.3, CX149420.1, CB493482.1, CU073506.1, BX878527.3	Vários tecidos, embrião e adulto
	Progegl2	GW823895.1, GW824484.1, GW824096.1, GW823728.1, GW824430.1	Branquias
<i>Sparus aurata</i>	Progegl2	CA330781.1	Cérebro
<i>Takifugu rubripes</i>	Progegl1	FO235152.1, FO247561.1	Embrião e larva
<i>Aspivanax mexicanus</i>	Progegl2	EE392505.1	Fígado
<i>Gobiocypris rarus</i>	Progegl2	GH240900.1, GH242386.1, GH242385.1, GH249146.1, GH242216.1, GH242215.1, GH252861.1, GH252860.1, GH246663.1, GH243133.1, GH244006.1, GH267980.1, GH247869.1, GH247868.1, GH267981.1, GH244005.1, GH243134.1, GH267981.1, GH244005.1, GH243134.1	Rim, Baço, brânquias e coração
<i>Esox lucius</i>	GIP	EL562361.1	Vários tecidos
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Progegl2	EL562361.1	Cérebro, rim e baço
	GCG b precursor	EL562362.1	

**Tabela anexo 6. Percentagens de identidade e similaridade do ligando GCG completo; GCG 1 (GCG+GLP1+GLP2) e GCG 2 (GCG+GLP1), na lampreia I (GCG+GLP1+GLP2) e lampreia II (GCG+GLP2).**

	Galinha	Celacanto	Tilápia (1)	Takifugu (1)	Peixe zebra (1)	Tilápia (2)	Takifugu (2)	Peixe zebra (2)	Spotted gar	Lampreia I	Lampreia II
Humano	65	40	37	37	36	37	36	39	49	33	24
Galinha	77	55	60	60	56	52	50	50	70	52	37
	100	44	37	39	38	34	32	34	51	28	20
Celacanto		53	56	56	54	46	44	45	65	43	31
		100	33	35	31	24	22	23	51	21	14
			49	51	45	36	34	33	62	32	21
Tilápia (1)			100	74	53	38	38	39	54	31	20
				85	69	53	52	55	71	48	32
Takifugu (1)				100	53	39	39	42	56	30	19
					67	51	50	54	72	47	33
Peixe zebra (1)					100	37	36	37	53	29	18
						46	45	47	65	48	33
Tilápia (2)						100	83	73	50	30	27
							90	86	60	42	49
Takifugu (2)							100	70	46	29	29
								82	57	42	50
Peixe zebra (2)								100	48	30	29
									60	42	52
Spotted gar									100	32	23
										50	37
Lampreia I										100	33
											47

**Tabela anexo 7. Percentagem de identidade e similaridade para o GIP.**

	<b>Galinha</b>	<b>Tilápia</b>	<b>Peixe zebra</b>	<b>Peixe das cavernas</b>
<b>Humano</b>	20 34	11 16	13 22	15 26
<b>Galinha</b>	100	12 26	15 29	19 30
<b>Tilápia</b>		100	13 17	36 46
<b>Peixe Zebra</b>			100	20 22

**Tabela anexo 8. Percentagem de identidade e similaridade para o péptido preditivo GCRP**

	<b>Celacanto</b>	<b>Tilápia</b>	<b>Takifugu</b>	<b>Spotted gar</b>
<b>Galinha</b>	93 96	68 75	62 75	69 78
<b>Celacanto</b>	100	68 75	65 75	66 78
<b>Tilápia</b>		100	62 75	63 75
<b>Takifugu</b>			100	63 75

**Tabela anexo 9. Percentagens de identidade e similaridade do péptido maduro GGC. 1 e 2 refere-se ao facto de nos peixes existirem duas sequências para o GCG.**

	Galinha	Celacanto	Tilápia (1)	Takifugu (1)	Peixe zebra (1)	Tilápia (2)	Takifugu (2)	Peixe zebra (2)	Spotted gar	Lampreia I	Lampreia II
Humano	96	86	72	72	79	75	75	79	89	72	72
	100	96	93	93	96	96	96	100	100	96	93
Galinha	100	89	68	68	75	72	72	75	93	68	68
		96	93	93	96	96	96	100	100	96	93
Celacanto		100	62	62	72	68	68	72	89	65	65
			89	89	93	93	93	96	96	89	89
Tilápia (1)			100	100	86	82	82	86	72	75	55
				100	93	93	93	96	93	96	89
Takifugu (1)				100	86	82	82	86	93	75	55
					93	93	93	96	96	96	89
Peixe zebra (1)					100	93	93	96	82	75	55
						96	96	100	96	96	89
Tilápia (2)						100	100	96	79	68	55
							100	96	96	93	89
Takifugu (2)							100	96	79	68	55
								96	96	93	89
Peixe zebra (2)								100	82	72	55
									100	96	93
Spotted gar									100	65	65
										93	93
Lampreia I										100	72
											89

**Tabela anexo 10. Percentagens de identidade e similaridade do péptido maduro GLP1.** 1 e 2 refere-se ao facto de nos peixes existirem duas sequências para o GLP1.

	Galinha	Tilápia (1)	Takifugu (1)	Peixe zebra (1)	Tilápia (2)	Takifugu (2)	Peixe zebra (2)	<i>Spotted gar</i>	Lampreia
Humano	87 96	61 80	64 80	67 83	74 90	67 87	74 90	64 87	48 83
Galinha	100	51 83	54 80	64 87	70 90	64 87	70 90	61 83	48 80
Tilápia (1)		100	90 96	70 87	67 90	64 87	67 90	70 80	48 70
Takifugu (1)			100	70 87	70 87	67 83	70 87	74 80	51 70
Peixe zebra (1)				100	77 93	74 90	77 93	80 87	48 74
Tilápia (2)					100	93 96	<b>100</b> <b>100</b>	83 93	54 77
Takifugu (2)						100	93 96	80 90	51 77
Peixe zebra (2)							100	83 93	54 77
<i>Spotted gar</i>								100	51 77

**Tabela anexo 11. Percentagens de identidade e similaridade do péptido maduro GLP2.** I e II referem-se ao facto de na lampreia existirem duas sequências para o GLP2.

	Galinha	Celacanto	Tilápia	Takifugu	Peixe zebra	<i>Spotted gar</i>	Lampreia I	Lampreia II
Humano	54 82	48 80	34 74	31 77	34 74	42 80	25 48	40 68
Galinha	100	71 85	54 77	57 77	54 82	54 82	25 40	45 65
Celacanto		100	62 80	62 82	68 82	68 85	25 37	45 62
Tilápia			100	91 94	85 88	77 88	22 42	42 60
Takifugu				100	80 85	71 85	22 40	40 60
Peixe zebra					100	77 82	22 45	40 62
<i>Spotted gar</i>						100	28 45	40 62
Lampreia I							100	34 48

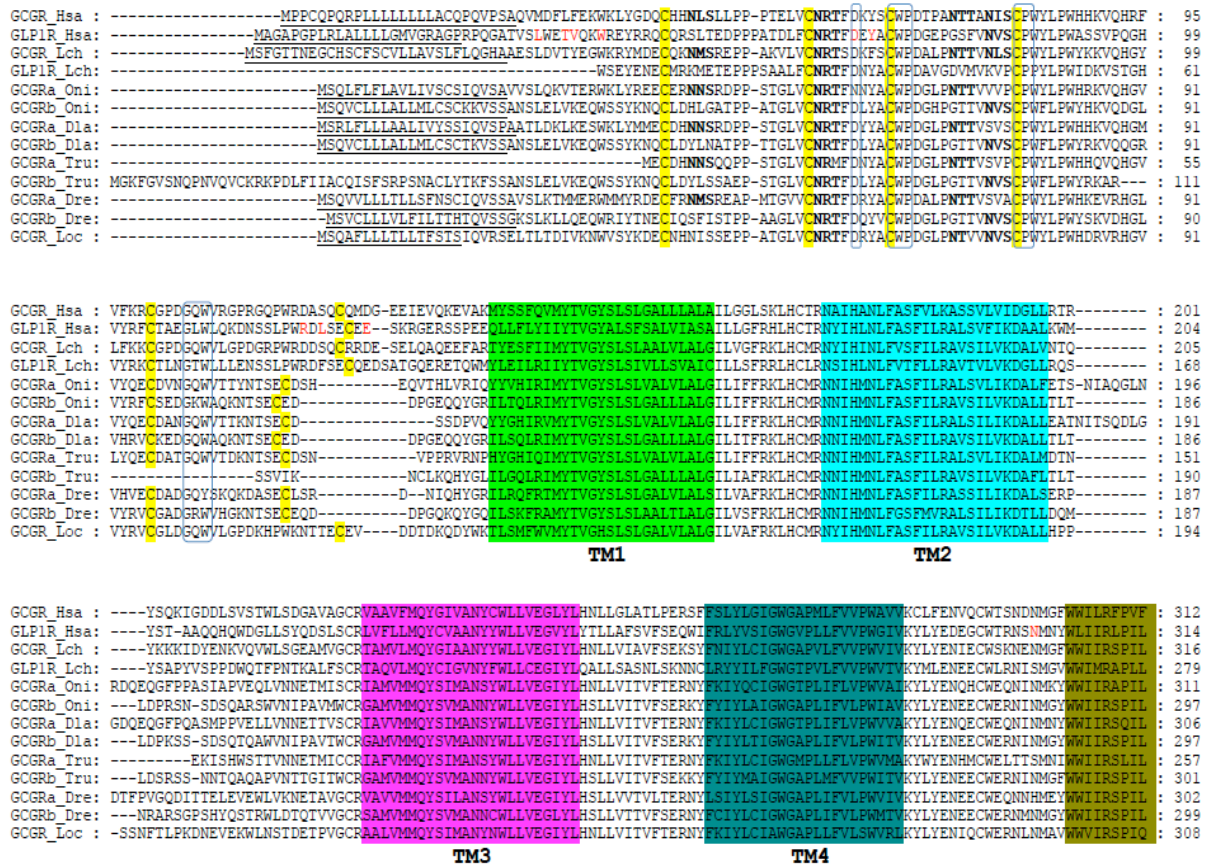
**Tabela anexo 12. Percentagens de identidade e similaridade para o péptido maduro GIP em galinha, tilápia, peixe zebra e peixe das cavernas.**

	Galinha	Tilápia	Peixe zebra	Peixe das cavernas
<b>Humano</b>	42 66	35 57	40 59	42 57
<b>Galinha</b>	100	40 78	47 76	52 73
<b>Tilápia</b>		100	61 78	67 80
<b>Peixe zebra</b>			100	80 83
<b>Peixe das cavernas</b>				100

**Tabela anexo 13. Percentagens de identidade e similaridade para o péptido maduro GCRP em galinha, celacanto, tilápia, takifugu, *spotted gar*.**

	<b>Celacanto</b>	<b>Tilápia</b>	<b>Takifugu</b>	<b><i>Spotted gar</i></b>
<b>Galinha</b>	96 96	84 92	73 84	88 100
<b>Celacanto</b>	100	84 92	73 84	84 96
<b>Tilápia</b>		100	73 84	80 92
<b>Takifugu</b>			100	76 84

**Figura anexo 1.** Alinhamento de seqüências de aminoácidos do recetor GCGR/GCGRa e GCGRb/GLP1R no humano (Hsa), celacante (Lch), tilápia (Oni), robalo (Dla), takifugu (Tru), peixe zebra (Dre) e *spotted gar* (Loc). Identificação das 6 cisteínas e outros domínios conservados e das 7 regiões transmembranares. As letras marcadas a vermelho correspondem aos locais de interação com os ligandos, as letras assinaladas a negrito correspondem aos locais de glicosilação. A sublinhado encontra-se a região do péptido sinal e em caixas estão os motivos funcionais.



```

GCGR_Hsa : LAALINFFIFVRIVQLLVAKLRARQMHHDYKFRLAKSTLTLIPLLGVHEVFAFVDEHAQG---TLRSAKLFFDLFLSSFGQLLVAVLYCFLNKEVQSELRRWRHWRWRLGKVL : 424
GLP1R_Hsa : FAIGVNFILFVRYVICIVSVKLRANLMCKTDIKCRLAKSTLTLIPLLGTHEVIFAFVMEHARG---TLRFIKLFTLELFTSFGQLMVAIILYCFVNNKEVQSELPKSWERWRLEHLH : 426
GCGR_Lch : FAILINFFIFIRIKILVSKLRAHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHEVVFVITEHAQG---TLRCIKLFFELFFNSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEILKWKWRWKLKDI : 428
GLP1R_Lch : AALINFLIFIRIKILLVSRHNSRLTFSNSKQRLAKVITLTIPLLGLHETLFAFVIDESAVG---LLRTVKLFFVELLLSSVQGCIVIVLYFFINFEVQPELAKFWEKLRGK--- : 388
GCGRa_Oni : AAVMINFLIFIRIKILVSKLRAHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHNVVIFATDESTSG-SIGLRLTRLFFSDFLFFSSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEILKWKWRWKLGRNI : 425
GCGRb_Oni : FAYLINFFIFIRIKILMSKLRHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHAILFTFVIDESVPK-GSVLRLVRLFCDDLFFNSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEMLKWKWRWKLKDI : 411
GCGRa_Dla : LAVVINFLIFIRIKILVSKLRAHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHQVWFVVIDESTKT-TIGLRLTKLFDLFFSSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEILKWKWRWKLGRNI : 420
GCGRb_Dla : FAYLINFFIFIRIKILMSKLRHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHAILFTFVIDESVPK-GSMLRLRLFCDDLFFNSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEMLKWKWRWKLKDI : 411
GCGRa_Tru : LAVVINFLIFIRIKILVSKLRAHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHMMVTFVIDESTHS-TISLRLTKLFDLFFSSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEILKWKWRWKLGRNI : 371
GCGRb_Tru : FAYLINFFIFIRIKILMSKLRHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHAILFTFVIDESVQK-GSLRLRLRFDLFFSSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEMLKWKWRWKLKDI : 415
GCGRa_Dre : LAVLINFFIFIRIKILVSKLRAHQMRYSDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHNSVLFVVIDESTSHGALPLRLTKLFDLFFNSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEILKWKWRWKLGRDI : 417
GCGRb_Dre : FAYLINFFIFIRIKILMSKLRHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHAVLFTFVIDESVPK-ESLRLRLRFDLFFSSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEMLKWKWRWKLKDI : 413
GCGR_Loc : LAALINFFIFIRIKILVSKLRAHQMRYTDYKFRLAKSTLTLIPLLGIHEVFAFVDEHAQG---SLRLVKLFFELFFSSFGQLLVAILYCFVNNKEVQSEILKWKWRWKLGRDI : 420
    
```

**TM5**

**TM6**

**TM7**

```

GCGR_Hsa : WEERNISN-----HRASSSPG-----HGPPSKELQFGRGGGSDSSAETPLAGLPLRL : 472
GLP1R_Hsa : IQ-----RDSMKPLKCPSSLSGGATAGSSMYTATQ : 459
GCGR_Lch : DEEYKHTYSQMPQAKTG-----SSNQDKHRLVSSHNG-----TGKSKQAPHADPHDNGKNGSSATEQITLSEKHLHCYEFPPQE : 502
GLP1R_Lch : -----RDSRIEVFHTQSGSESVGCASQFE----- : 412
GCGRa_Oni : EEEYRHTYSN-TPNKTASLLNHAP-----RMPHLPDIAKTTAPVCSPEERHMLVASNQNG----MVHSTEKGKASLLHEGTISNYFLVEDISITDKLQCYEVQKE : 522
GCGRb_Oni : DEEYRHTHSQTPHKVSGSIATGNVNPNTSD----PSADWPRFNKANGSPVCSAATEENRKLVSFSNGTGKCRPVKSRHTLHFSFQSHRGATS--STATEDVCLEERVKYRSYTL : 519
GCGRa_Dla : EEEYRHTYSN-TPNKTGSLLNHVS-----RLPHLPDIAKTSAVCTPEERHMLVAGCHNG----MLHKSKEENQCASPLHEGTISNCTLVEDI SLTDKVCYEGQRE : 517
GCGRb_Dla : DEEYRHTHSQTPHKVSGSIATGNLPLVLDHNNASDPSGDSPRLNKADRAPTCSAABEENRLLVSYNGTGKGRPAKSRHTLQFSFLPHRGAASHVSTATEDVCLLEEKAPCRITYPL : 526
GCGRa_Tru : EEEYRHTYSN-THNKTGSLLNHVS-----QLPHLPDVAKTSQPCINPEETHMLVAECYNG----SAHGGVEEHGPPPTACEGNVSRCTLVEDISLTDRAPOCEGHRE : 468
GCGRb_Tru : DEEYRHTYSQTPHLKSGSIATGNLLHENN-ASDPSGDSPRLGRANREPLCSIAPEENRRLVSVYRNGSQKGRPARG--SLRFSFLVQIGTAGRVSTITTEDARLEGKE----LPL : 523
GCGRa_Dre : EEEYRHTYSQSLQIKSGSIMVHPT-----NLPRLPDIATTTSRLGSPPEEKQMLVSSSQNG----MGIQGCQLFTSTQDQG-STCSSITEDMVDREYRCRVAQG : 514
GCGRb_Dre : DEEYRHTHSQTPHAKSSTAPP-----AAHDCPDISSLESQRLVTGLQNGLSRSR--GRARLQFTSQTEGASNCSSLTEDI CLEERPLNNEGSA : 502
GCGR_Loc : EEEYRHTYSQTPQVRNGSTAAGAAP-----APGEEHKLVGSVQNG----TGHSKHSLOPPAPLEGAACTSTLKESSSLGDKAHCEYFPLE : 501
    
```

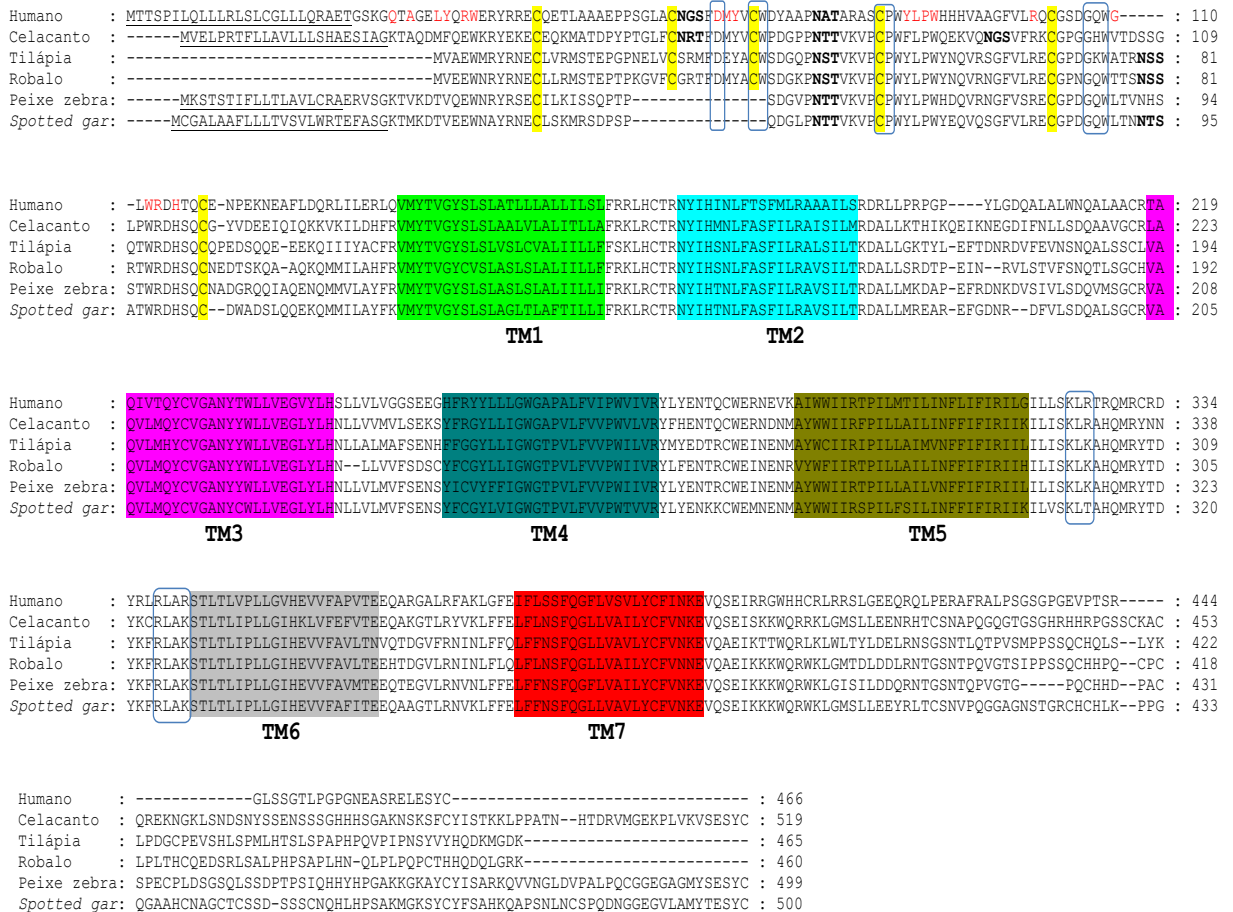
```

GCGR_Hsa : AESPF-- : 477
GLP1R_Hsa : ASCS--- : 463
GCGR_Lch : TAESNF- : 508
GLP1R_Lch : ----- : -
GCGRa_Oni : NMESSL- : 528
GCGRb_Oni : EGEETNV : 526
GCGRa_Dla : NVESHL- : 523
GCGRb_Dla : EGQETNV : 533
GCGRa_Tru : NVESHM- : 474
GCGRb_Tru : EGEETNV : 530
GCGRa_Dre : NAESNL- : 520
GCGRb_Dre : VLEETNV : 509
GCGR_Loc : SAESNF- : 507
    
```

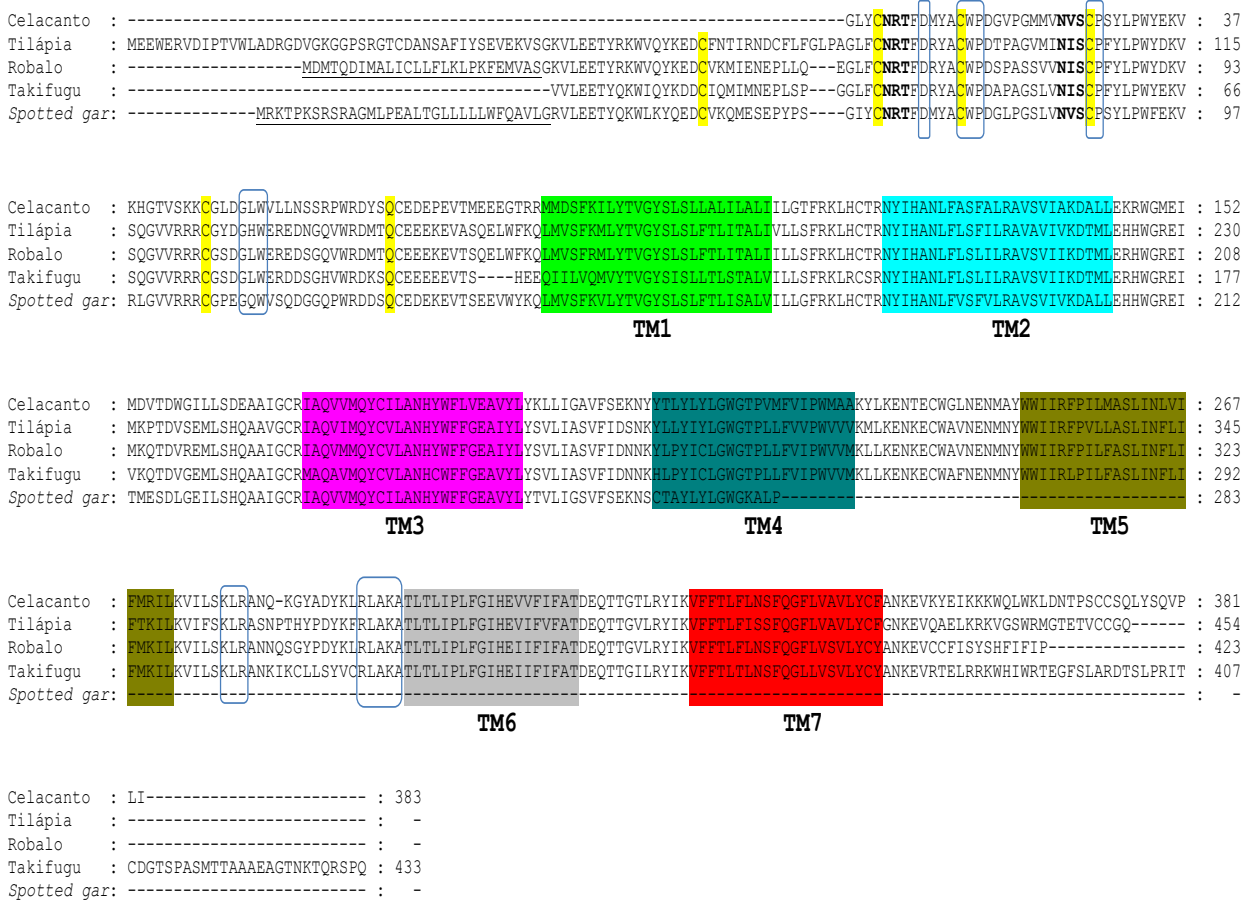
**Figura anexo 2. Alinhamento de seqüências de aminoácidos do recetor GLP2R.** Identificação das 6 cisteínas e outras regiões/motivos conservadas das 7 regiões transmembranares. A negrito encontram-se assinalados os locais de glicosilação, as letras vermelhas correspondem aos locais de interação com o ligando no humano e o sublinhado representa a região do péptido sinal, e em caixas estão os motivos funcionais.

Humano	:	MKLGSSRAGPGRGSAGLLPGVHELPMGIPAPWGTSPLSFHRKCSLWAPGRPFLLTVLLVSIKQVTSLLLEETTRKWAQYKQALCRDLLLKE---PSGIFC <b>NGT</b> FQVVCWPHSSPG :	112
Celacanto	:	-----PIFKLMDLLIPLQAKGASLEDITRMWFYKQCCNLTITSESVYRTGVY <b>NGT</b> FQVVCWPHSSPPG :	65
Tilápia	:	-----MPAPLPAWHKRT-----KLLLTLLFIIYNNQKVTGSLESLELIARNEYKNC <b>NT</b> LVASALSITGNYCKGAFDMFVVCWPHSSPG :	79
Robalo	:	-----MPTLLPTWHKRTRTAGTFFLLSLVFVFNHQVSGSELETLIAKRTEYWEN <b>NR</b> --TLSALLEGTGYCKGTFDTFVVCWPHSSPG :	82
Takifugu	:	-----GSMLESLIMKRAEYLES <b>NTS</b> --LGMLSQGTGYCKGTFDMFVVCWPHSSAPG :	48
Peixe zebra	:	-----EVSGSVLDDLIYKRSEY <b>Q</b> EN <b>CT</b> RFLLTATLPAAGTGTFC <b>NGT</b> FQVVCWPHSSPG :	53
Spotted gar	:	-----NTSNAQSAWAQAIMNVKARKQVCLMVMGSGLKETMRKWEYR <b>AN</b> CTNMLANKSLQGTGVYCKGSEFDMFVVCWPHSSPPG :	76
TM1			
Humano	:	<b>N</b> VS <b>V</b> PCPSYLPWSEESSGRAYRH <b>LAQ</b> GT <b>W</b> TI <b>EN</b> AT <b>DI</b> WQDDSE <b>SEN</b> -HSFKQNDVRYA <b>LLSTLQ</b> LM <b>T</b> VG <b>S</b> FS <b>L</b> SL <b>S</b> L <b>F</b> LT <b>L</b> LLFLRKLHCTRN <b>Y</b> I <b>H</b> NM <b>L</b> F <b>S</b> F <b>I</b> L <b>R</b> AM :	226
Celacanto	:	<b>N</b> VS <b>V</b> PCPSYLPWVKKGSTGRVYR <b>CS</b> HK <b>L</b> W <b>D</b> T <b>V</b> Q <b>NS</b> T <b>V</b> WRD <b>H</b> SE <b>S</b> Q <b>H</b> N <b>Q</b> Y <b>F</b> Q <b>T</b> EQ <b>E</b> HL <b>L</b> L <b>T</b> V <b>I</b> R <b>F</b> L <b>T</b> Y <b>V</b> G <b>S</b> L <b>S</b> L <b>S</b> L <b>L</b> L <b>L</b> AV <b>L</b> LL <b>L</b> LM <b>R</b> KL <b>H</b> CTRN <b>Y</b> I <b>H</b> LN <b>L</b> F <b>C</b> S <b>F</b> L <b>R</b> AM :	180
Tilápia	:	<b>N</b> VS <b>V</b> PCPSYLPWISDDT <b>S</b> RS <b>A</b> HR <b>E</b> CL <b>EN</b> CR <b>WR</b> Q <b>M</b> EN <b>S</b> SE <b>P</b> WRD <b>V</b> SE <b>CE</b> EH-HYFKD <b>K</b> E <b>D</b> E <b>M</b> L <b>R</b> HT <b>A</b> L <b>R</b> L <b>I</b> S <b>V</b> I <b>G</b> S <b>L</b> S <b>L</b> S <b>L</b> L <b>I</b> L <b>A</b> T <b>L</b> LM <b>G</b> ML <b>R</b> KL <b>H</b> CTRN <b>Y</b> I <b>H</b> NM <b>L</b> F <b>S</b> F <b>I</b> L <b>R</b> AA :	193
Robalo	:	<b>N</b> VS <b>V</b> PCPSYLPWIKED <b>V</b> SR <b>R</b> VH <b>R</b> ECL <b>EN</b> CR <b>WR</b> Q <b>R</b> EN <b>S</b> SE <b>P</b> WRD <b>D</b> SE <b>CK</b> ED-DYFKD <b>K</b> E <b>D</b> E <b>L</b> H <b>R</b> Q <b>T</b> A <b>L</b> R <b>L</b> I <b>S</b> V <b>I</b> G <b>S</b> L <b>S</b> L <b>S</b> L <b>T</b> L <b>A</b> T <b>L</b> LM <b>G</b> ML <b>R</b> KL <b>H</b> CTRN <b>Y</b> I <b>H</b> NM <b>L</b> F <b>S</b> F <b>I</b> L <b>R</b> AM :	196
Takifugu	:	<b>N</b> VS <b>V</b> PCPSYLPWISED <b>G</b> SR <b>A</b> HR <b>E</b> CL <b>EN</b> CR <b>WR</b> E <b>R</b> EN <b>S</b> SE <b>P</b> WRD <b>D</b> SE <b>CK</b> ED-HYFKD <b>K</b> E <b>D</b> E <b>M</b> H <b>L</b> Q <b>T</b> A <b>L</b> R <b>L</b> I <b>S</b> I <b>G</b> S <b>L</b> S <b>L</b> S <b>L</b> F <b>S</b> L <b>T</b> V <b>A</b> T <b>L</b> VM <b>A</b> ML <b>R</b> KL <b>H</b> CTRN <b>Y</b> I <b>H</b> NM <b>L</b> F <b>S</b> F <b>I</b> L <b>R</b> AM :	162
Peixe zebra	:	<b>N</b> VS <b>V</b> PCPSYLPWIREG <b>A</b> T <b>G</b> N <b>V</b> Y <b>K</b> E <b>T</b> V <b>N</b> CT <b>W</b> K <b>T</b> E <b>EN</b> S <b>S</b> W <b>R</b> N <b>D</b> SE <b>CK</b> ENH-YFPK <b>S</b> E <b>V</b> N <b>I</b> A <b>A</b> <b>Q</b> S <b>V</b> L <b>R</b> V <b>S</b> I <b>V</b> G <b>S</b> L <b>S</b> F <b>S</b> S <b>L</b> C <b>L</b> A <b>V</b> L <b>I</b> MS <b>L</b> LR <b>K</b> L <b>H</b> CTRN <b>Y</b> I <b>H</b> LN <b>L</b> F <b>S</b> F <b>I</b> MP <b>F</b> RA <b>I</b> :	167
Spotted gar	:	IVS <b>I</b> LCPSYLP <b>I</b> F <b>T</b> E <b>G</b> R <b>T</b> G <b>Y</b> L <b>R</b> N <b>CT</b> D <b>G</b> T <b>W</b> L <b>T</b> I <b>EN</b> S <b>S</b> E <b>I</b> W <b>R</b> N <b>H</b> SE <b>CA</b> EP <b>S</b> H <b>H</b> FR <b>P</b> Q <b>E</b> E <b>E</b> K <b>T</b> <b>W</b> Q <b>V</b> L <b>R</b> I <b>V</b> Y <b>T</b> I <b>G</b> S <b>L</b> S <b>S</b> L <b>S</b> L <b>S</b> L <b>A</b> V <b>I</b> LL <b>L</b> LR <b>K</b> L <b>H</b> CTRN <b>F</b> I <b>H</b> LN <b>L</b> F <b>T</b> S <b>F</b> L <b>R</b> AM :	191
TM2			
Humano	:	<b>A</b> VL <b>V</b> K <b>D</b> V <b>F</b> Y <b>N</b> S <b>Y</b> SK <b>R</b> PN <b>E</b> NG <b>M</b> S <b>Y</b> LS-EM <b>S</b> T <b>S</b> CR <b>S</b> V <b>Q</b> V <b>L</b> L <b>H</b> F <b>Y</b> G <b>A</b> N <b>I</b> L <b>W</b> L <b>L</b> V <b>E</b> G <b>L</b> Y <b>L</b> H <b>T</b> L <b>L</b> E <b>P</b> T <b>V</b> L <b>P</b> ERR <b>L</b> <b>N</b> PR <b>Y</b> LL <b>L</b> G <b>W</b> A <b>F</b> P <b>V</b> L <b>F</b> V <b>P</b> W <b>G</b> F <b>A</b> RA <b>H</b> LE <b>N</b> T <b>G</b> W <b>T</b> T <b>N</b> G <b>N</b> K <b>---</b> :	338
Celacanto	:	<b>A</b> V <b>F</b> V <b>K</b> D <b>S</b> L <b>D</b> H <b>T</b> Y <b>S</b> K <b>R</b> PN <b>E</b> M <b>G</b> W <b>T</b> S <b>Y</b> F <b>K</b> S <b>Q</b> L <b>S</b> MA <b>C</b> R <b>A</b> TH <b>I</b> LM <b>N</b> Y <b>F</b> V <b>V</b> AN <b>H</b> Y <b>W</b> LL <b>V</b> E <b>G</b> I <b>Y</b> L <b>H</b> T <b>L</b> L <b>V</b> T <b>V</b> L <b>S</b> E <b>K</b> R <b>L</b> <b>L</b> Q <b>R</b> Y <b>L</b> I <b>G</b> W <b>F</b> P <b>V</b> L <b>F</b> V <b>P</b> W <b>I</b> T <b>K</b> AL <b>Y</b> EN <b>K</b> G <b>C</b> W <b>T</b> A <b>Q</b> S <b>F</b> K <b>S</b> G :	295
Tilápia	:	<b>A</b> IL <b>S</b> KE <b>I</b> IM <b>H</b> IM <b>S</b> N <b>L</b> PK <b>D</b> D <b>P</b> GW <b>N</b> Y <b>S</b> SS <b>P</b> IV <b>I</b> MC <b>R</b> L <b>S</b> K <b>V</b> C <b>M</b> E <b>F</b> V <b>A</b> C <b>N</b> Y <b>F</b> W <b>L</b> L <b>V</b> E <b>A</b> I <b>F</b> L <b>H</b> T <b>L</b> L <b>F</b> A <b>V</b> L <b>T</b> K <b>R</b> CL <b>L</b> K <b>Y</b> M <b>L</b> L <b>G</b> W <b>T</b> P <b>A</b> L <b>F</b> V <b>P</b> W <b>T</b> V <b>K</b> IL <b>E</b> N <b>T</b> E <b>C</b> W <b>---</b> :	304
Robalo	:	<b>A</b> V <b>I</b> S <b>K</b> E <b>I</b> IL <b>Y</b> IM <b>S</b> N <b>L</b> PK <b>D</b> D <b>P</b> GW <b>N</b> S <b>Y</b> SS <b>V</b> I <b>A</b> LM <b>C</b> K <b>I</b> S <b>K</b> V <b>C</b> M <b>E</b> F <b>V</b> A <b>C</b> N <b>Y</b> F <b>W</b> L <b>L</b> V <b>E</b> A <b>I</b> F <b>L</b> H <b>T</b> L <b>L</b> F <b>A</b> V <b>L</b> T <b>K</b> R <b>R</b> L <b>L</b> K <b>R</b> Y <b>M</b> L <b>L</b> G <b>W</b> T <b>P</b> V <b>L</b> F <b>V</b> P <b>T</b> V <b>V</b> K <b>I</b> L <b>E</b> N <b>T</b> G <b>C</b> W <b>---</b> :	307
Takifugu	:	<b>A</b> V <b>I</b> L <b>K</b> E <b>I</b> IF <b>Y</b> I <b>K</b> H <b>F</b> N <b>L</b> PK <b>D</b> D <b>P</b> GW <b>K</b> S <b>Y</b> AD <b>S</b> A <b>I</b> V <b>L</b> SCR <b>V</b> S <b>A</b> V <b>C</b> M <b>Q</b> Y <b>F</b> V <b>A</b> C <b>N</b> Y <b>F</b> W <b>L</b> L <b>V</b> E <b>A</b> V <b>L</b> H <b>T</b> L <b>L</b> F <b>A</b> V <b>L</b> T <b>K</b> R <b>R</b> L <b>L</b> K <b>R</b> Y <b>M</b> L <b>L</b> G <b>W</b> T <b>P</b> V <b>L</b> F <b>V</b> P <b>T</b> V <b>V</b> K <b>I</b> L <b>E</b> N <b>T</b> G <b>C</b> W <b>---</b> :	273
Peixe zebra	:	<b>A</b> V <b>I</b> T <b>K</b> E <b>V</b> L <b>Q</b> V <b>A</b> Y <b>S</b> N <b>L</b> PR <b>D</b> EV <b>G</b> W <b>N</b> S <b>Y</b> T <b>K</b> S <b>A</b> I <b>S</b> F <b>I</b> C <b>A</b> S <b>K</b> S <b>V</b> S <b>L</b> E <b>Y</b> F <b>V</b> G <b>C</b> N <b>Y</b> F <b>W</b> L <b>L</b> V <b>E</b> A <b>V</b> L <b>H</b> T <b>L</b> L <b>F</b> A <b>V</b> L <b>T</b> R <b>K</b> T <b>L</b> L <b>K</b> Y <b>I</b> F <b>I</b> G <b>W</b> G <b>T</b> P <b>L</b> L <b>F</b> V <b>I</b> P <b>W</b> T <b>V</b> A <b>K</b> L <b>E</b> N <b>K</b> S <b>C</b> W <b>---</b> :	278
Spotted gar	:	<b>V</b> IL <b>A</b> KE <b>I</b> IL <b>Y</b> ET <b>S</b> Y <b>S</b> K <b>R</b> PK <b>D</b> ET <b>G</b> W <b>I</b> Y <b>I</b> LN <b>S</b> EN <b>S</b> P <b>F</b> CR <b>A</b> V <b>Q</b> V <b>M</b> HY <b>L</b> I <b>G</b> AN <b>A</b> E <b>F</b> W <b>L</b> L <b>V</b> E <b>G</b> I <b>F</b> L <b>H</b> T <b>L</b> L <b>V</b> T <b>P</b> V <b>L</b> SE <b>K</b> R <b>L</b> <b>L</b> K <b>Y</b> M <b>V</b> I <b>G</b> W <b>G</b> T <b>P</b> I <b>M</b> E <b>V</b> V <b>P</b> W <b>A</b> V <b>T</b> K <b>A</b> L <b>Y</b> EN <b>E</b> NG <b>C</b> W <b>R</b> ---NT <b>M</b> :	303
TM3			
Humano	:	- <b>I</b> W <b>I</b> IR <b>G</b> P <b>M</b> ML <b>C</b> - <b>V</b> T <b>V</b> N <b>F</b> I <b>F</b> L <b>K</b> IL <b>L</b> LL <b>S</b> KL <b>K</b> A <b>H</b> Q <b>M</b> C <b>F</b> R <b>D</b> Y <b>K</b> Y <b>R</b> L <b>A</b> K <b>S</b> T <b>L</b> V <b>L</b> I <b>P</b> LL <b>G</b> V <b>H</b> E <b>I</b> L <b>F</b> S <b>F</b> L <b>T</b> DD <b>Q</b> V <b>E</b> G <b>F</b> A <b>K</b> L <b>I</b> R <b>L</b> <b>F</b> I <b>Q</b> L <b>T</b> L <b>S</b> S <b>F</b> H <b>G</b> L <b>V</b> A <b>L</b> Q <b>V</b> G <b>A</b> NG <b>E</b> V <b>Q</b> A <b>E</b> L <b>R</b> K <b>Y</b> W :	451
Celacanto	:	W <b>L</b> L <b>W</b> L <b>K</b> A <b>G</b> E <b>S</b> L <b>R</b> - <b>I</b> Q <b>V</b> N <b>F</b> Y <b>I</b> F <b>I</b> K <b>I</b> IL <b>L</b> LL <b>S</b> KL <b>K</b> A <b>R</b> Q <b>L</b> R <b>F</b> S <b>D</b> Y <b>K</b> H <b>R</b> L <b>A</b> R <b>S</b> T <b>L</b> V <b>L</b> I <b>S</b> V <b>F</b> G <b>I</b> Q <b>E</b> V <b>V</b> F <b>A</b> F <b>T</b> DD <b>Q</b> V <b>E</b> G <b>L</b> S <b>R</b> I <b>R</b> <b>L</b> F <b>I</b> Q <b>L</b> P <b>L</b> S <b>S</b> F <b>Q</b> Y <b>I</b> Y <b>I</b> K <b>N</b> I <b>H</b> G <b>L</b> FF <b>Q</b> V <b>Q</b> T <b>E</b> L <b>K</b> K <b>R</b> W :	409
Tilápia	:	G <b>F</b> W <b>I</b> IR <b>G</b> P <b>I</b> T <b>L</b> S <b>-</b> V <b>L</b> V <b>I</b> F <b>I</b> F <b>I</b> K <b>I</b> IL <b>L</b> LL <b>S</b> KL <b>K</b> A <b>D</b> Q <b>V</b> K <b>F</b> D <b>Y</b> R <b>Y</b> S <b>L</b> A <b>R</b> A <b>T</b> L <b>V</b> L <b>I</b> PL <b>L</b> G <b>I</b> H <b>E</b> V <b>V</b> F <b>T</b> V <b>L</b> I <b>D</b> E <b>C</b> V <b>D</b> G <b>S</b> S <b>R</b> Y <b>A</b> R <b>N</b> F <b>V</b> N <b>L</b> T <b>L</b> S <b>S</b> F <b>Q</b> G <b>L</b> V <b>A</b> V <b>L</b> Y <b>C</b> H <b>A</b> N <b>E</b> V <b>Q</b> A <b>E</b> L <b>K</b> K <b>R</b> W :	418
Robalo	:	W <b>F</b> W <b>I</b> IR <b>G</b> P <b>I</b> T <b>L</b> S <b>-</b> V <b>L</b> V <b>I</b> F <b>I</b> F <b>I</b> K <b>I</b> IL <b>L</b> LL <b>S</b> KL <b>K</b> A <b>D</b> Q <b>V</b> K <b>F</b> D <b>Y</b> R <b>Y</b> S <b>L</b> A <b>R</b> A <b>T</b> L <b>V</b> L <b>I</b> PL <b>L</b> G <b>I</b> H <b>E</b> V <b>V</b> F <b>T</b> V <b>L</b> I <b>D</b> E <b>C</b> V <b>E</b> G <b>S</b> S <b>R</b> Y <b>A</b> R <b>N</b> F <b>V</b> N <b>L</b> T <b>L</b> S <b>S</b> F <b>Q</b> G <b>L</b> V <b>A</b> V <b>L</b> Y <b>C</b> H <b>A</b> N <b>E</b> V <b>Q</b> A <b>E</b> L <b>K</b> K <b>R</b> W :	421
Takifugu	:	W <b>I</b> W <b>I</b> IR <b>G</b> P <b>I</b> T <b>L</b> T <b>-</b> F <b>V</b> V <b>I</b> F <b>I</b> F <b>I</b> K <b>I</b> IL <b>L</b> LL <b>S</b> KL <b>K</b> A <b>D</b> Q <b>L</b> K <b>F</b> D <b>Y</b> R <b>Y</b> S <b>L</b> V <b>R</b> A <b>T</b> L <b>V</b> L <b>I</b> PL <b>L</b> G <b>I</b> H <b>E</b> V <b>V</b> F <b>M</b> V <b>L</b> T <b>D</b> E <b>C</b> M <b>E</b> G <b>S</b> L <b>Y</b> A <b>R</b> N <b>F</b> V <b>N</b> L <b>T</b> L <b>N</b> S <b>F</b> Q <b>G</b> L <b>V</b> A <b>V</b> L <b>Y</b> C <b>H</b> AN <b>E</b> V <b>Q</b> A <b>E</b> L <b>K</b> K <b>R</b> W :	387
Peixe zebra	:	W <b>I</b> W <b>I</b> IR <b>G</b> P <b>I</b> T <b>L</b> S <b>V</b> I <b>V</b> V <b>I</b> F <b>I</b> F <b>I</b> K <b>I</b> IL <b>L</b> LL <b>S</b> KL <b>K</b> A <b>D</b> Q <b>V</b> K <b>F</b> D <b>Y</b> R <b>Y</b> S <b>L</b> A <b>R</b> A <b>T</b> L <b>V</b> L <b>I</b> PL <b>L</b> G <b>V</b> H <b>-</b> IV <b>F</b> T <b>L</b> I <b>D</b> E <b>S</b> V <b>E</b> G <b>S</b> N <b>R</b> Y <b>A</b> R <b>N</b> F <b>V</b> H <b>L</b> T <b>L</b> S <b>S</b> F <b>Q</b> G <b>L</b> V <b>A</b> V <b>L</b> Y <b>C</b> H <b>A</b> N <b>E</b> V <b>Q</b> A <b>E</b> L <b>K</b> K <b>R</b> W :	392
Spotted gar	:	G <b>I</b> W <b>I</b> IR <b>G</b> P <b>I</b> R <b>E</b> S <b>-</b> I <b>A</b> V <b>N</b> F <b>I</b> L <b>F</b> I <b>K</b> IL <b>L</b> LL <b>W</b> K <b>L</b> K <b>A</b> E <b>K</b> M <b>T</b> F <b>N</b> D <b>Y</b> K <b>F</b> L <b>A</b> R <b>A</b> T <b>L</b> V <b>L</b> I <b>P</b> LM <b>G</b> I <b>H</b> E <b>I</b> V <b>A</b> F <b>M</b> D <b>E</b> Q <b>I</b> K <b>G</b> --R <b>Y</b> T <b>R</b> <b>S</b> F <b>I</b> Q <b>L</b> T <b>L</b> T <b>S</b> F <b>Q</b> G <b>L</b> V <b>A</b> V <b>L</b> Y <b>C</b> H <b>A</b> N <b>R</b> E <b>V</b> K <b>T</b> E <b>L</b> K <b>K</b> R <b>W</b> :	415
TM5			
Humano	:	V <b>R</b> F <b>L</b> L <b>A</b> R <b>H</b> S <b>G</b> CR <b>A</b> C <b>V</b> L <b>G</b> N <b>F</b> R <b>L</b> G <b>K</b> P <b>K</b> L <b>S</b> E <b>G</b> D <b>G</b> A <b>E</b> K <b>L</b> R <b>L</b> Q <b>P</b> S <b>L</b> NS <b>R</b> GL <b>L</b> H <b>A</b> M <b>R</b> G <b>L</b> E <b>L</b> G <b>A</b> Q <b>P</b> Q <b>Q</b> -----D <b>H</b> A <b>R</b> W <b>P</b> R <b>G</b> S <b>S</b> L <b>S</b> E <b>C</b> S <b>E</b> G <b>D</b> V <b>T</b> M <b>A</b> N <b>T</b> M <b>E</b> E <b>I</b> L <b>E</b> E <b>S</b> E <b>I</b> :	553
Celacanto	:	K <b>L</b> L <b>F</b> L <b>A</b> N <b>H</b> F <b>D</b> C <b>T</b> D <b>C</b> I <b>F</b> S <b>K</b> P <b>F</b> Y <b>L</b> G <b>K</b> Y <b>L</b> Q <b>R</b> R <b>N</b> Y <b>F</b> D <b>G</b> K <b>F</b> H <b>S</b> K <b>R</b> P <b>S</b> S <b>V</b> Q <b>L</b> L <b>Q</b> V <b>T</b> V <b>K</b> V <b>I</b> S <b>D</b> F <b>Q</b> S <b>Q</b> P-----I <b>P</b> L <b>E</b> Y <b>F</b> A <b>R</b> E <b>S</b> L <b>S</b> E <b>S</b> S <b>N</b> D <b>I</b> T <b>L</b> G <b>E</b> T <b>L</b> E <b>E</b> S <b>Q</b> I----	507
Tilápia	:	Q <b>L</b> F <b>L</b> T <b>N</b> H <b>F</b> K <b>V</b> R <b>C</b> T <b>F</b> R <b>G</b> M <b>L</b> K <b>L</b> W <b>K</b> C <b>T</b> R <b>G</b> H <b>P</b> R <b>C</b> S <b>R</b> Q <b>S</b> D <b>S</b> Y <b>D</b> E <b>G</b> G <b>I</b> S <b>T</b> V <b>H</b> P <b>H</b> L <b>Q</b> V <b>A</b> V <b>H</b> G <b>R</b> G <b>R</b> V <b>L</b> G <b>I</b> G <b>-</b> E <b>V</b> K <b>Q</b> A <b>L</b> N <b>G</b> Y <b>D</b> V <b>T</b> G <b>L</b> E <b>F</b> L <b>T</b> R <b>K</b> S <b>L</b> S <b>-</b> S <b>S</b> D <b>G</b> E <b>M</b> T <b>L</b> G <b>E</b> T <b>M</b> E <b>I</b> L <b>E</b> E <b>S</b> E <b>F</b> :	531
Robalo	:	Q <b>L</b> F <b>L</b> T <b>N</b> H <b>F</b> Q <b>V</b> R <b>S</b> C <b>F</b> G <b>V</b> L <b>K</b> L <b>W</b> K <b>C</b> T <b>R</b> G <b>H</b> P <b>R</b> C <b>S</b> R <b>Q</b> S <b>D</b> S <b>Y</b> D <b>E</b> G <b>G</b> T <b>S</b> T <b>H</b> P <b>H</b> L <b>Q</b> V <b>A</b> V <b>H</b> G <b>G</b> G <b>L</b> G <b>L</b> G <b>-</b> E <b>V</b> K <b>Q</b> G <b>L</b> K <b>G</b> F <b>D</b> T <b>T</b> G <b>L</b> D <b>F</b> L <b>T</b> R <b>K</b> S <b>L</b> S <b>-</b> S <b>S</b> D <b>G</b> E <b>T</b> L <b>G</b> E <b>T</b> M <b>E</b> E <b>I</b> L <b>E</b> E <b>S</b> E <b>F</b> :	534
Takifugu	:	Q <b>L</b> F <b>L</b> T <b>N</b> H <b>F</b> Q <b>V</b> R <b>S</b> C <b>F</b> G <b>Q</b> K <b>P</b> L <b>K</b> Q <b>L</b> W <b>K</b> C <b>T</b> Q <b>G</b> R <b>R</b> F <b>Q</b> C <b>S</b> R <b>Q</b> S <b>D</b> S <b>C</b> D <b>E</b> G <b>E</b> A <b>S</b> T <b>H</b> P <b>Q</b> L <b>Q</b> V <b>A</b> V <b>H</b> R <b>G</b> G <b>R</b> A <b>V</b> G <b>V</b> R <b>E</b> V <b>G</b> Q <b>Q</b> G <b>S</b> G <b>C</b> D <b>S</b> A <b>G</b> L <b>D</b> L <b>T</b> R <b>K</b> S <b>L</b> S <b>-</b> S <b>S</b> D <b>G</b> E <b>L</b> T <b>L</b> G <b>E</b> T <b>M</b> E <b>I</b> L <b>E</b> E <b>S</b> E <b>F</b> :	501
Peixe zebra	:	Q <b>L</b> L <b>V</b> S <b>S</b> S <b>S</b> F <b>E</b> V <b>H</b> S <b>C</b> F <b>S</b> D <b>I</b> H <b>P</b> K <b>L</b> W <b>K</b> F <b>S</b> Q <b>S</b> P <b>R</b> P <b>H</b> Q <b>H</b> D <b>T</b> N <b>E</b> E <b>G</b> D <b>Q</b> D <b>T</b> S <b>Q</b> P <b>H</b> L <b>Q</b> D <b>S</b> A <b>E</b> A <b>V</b> A <b>C</b> G <b>R</b> S-----S <b>G</b> L <b>E</b> Y <b>M</b> R <b>K</b> S <b>L</b> S <b>-</b> S <b>S</b> D <b>G</b> E <b>M</b> T <b>L</b> G <b>E</b> T <b>M</b> E <b>I</b> L <b>E</b> E <b>S</b> E <b>F</b> :	493
Spotted gar	:	Q <b>L</b> Y <b>L</b> F <b>A</b> N <b>H</b> F <b>D</b> Y <b>R</b> E <b>C</b> I <b>V</b> Q <b>R</b> L <b>R</b> C <b>L</b> G <b>K</b> Y <b>S</b> K <b>R</b> R <b>P</b> T <b>H</b> Y <b>F</b> D <b>H</b> S <b>K</b> S <b>H</b> G <b>E</b> R <b>K</b> R <b>S</b> S <b>N</b> V <b>Q</b> L <b>L</b> Q <b>V</b> T <b>M</b> R <b>S</b> S <b>G</b> N <b>L</b> K <b>L</b> Q <b>R</b> P-----V <b>G</b> L <b>E</b> H <b>F</b> T <b>R</b> G <b>V</b> S <b>-</b> S <b>S</b> E <b>G</b> E <b>T</b> L <b>G</b> E <b>T</b> L <b>E</b> E <b>I</b> L <b>E</b> E <b>S</b> D <b>F</b> :	516
TM6			
TM7			

**Figura anexo 3. Alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos do recetor GIPR.** Identificação das 6 cisteínas e outros domínios/motivos conservados, das 7 regiões transmembranares. Os locais de glicosilação estão assinalados a negrito, a vermelho estão marcados os locais de interação com o ligando e a sublinhado encontra-se a região do péptido sinal. Os motivos funcionais característicos encontram-se dentro de caixas.



**Figura anexo 4. Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos do recetor GCRPR.** Identificação das 6 cisteínas e outros domínios/motivos conservados e das 7 regiões transmembranares. A sublinhado encontra-se a região do péptido sinal das espécies que foi possível prever, as letras assinaladas a negrito correspondem aos locais de glicosilação. Os motivos funcionais característicos encontram-se dentro de caixas.



**Figura anexo 5. Alinhamento das sequências em aminoácidos do proglucagon, com indicação dos péptidos GLP1 e GLP2 no humano, galinha, celacanto, tilápia, takifugu, peixe zebra, *spotted gar*, e lampreia. Assinalado a sublinhado temos a região do peptídeo sinal, a vermelho os resíduos responsáveis pela interação com o recetor no humano.**

	GCC	
Humano	: --MKSIVFVAG-LFVMLVQGSWQRLQDTEEKSRFSASQADPLSDPDQMNEDKRHSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTRN-----RNNIAKRHDEFE : 96	
Galinha	: MKMKSIVFIAG-LLLMIVQGSWQNPLODTEEKSRFKASQSEPLDESRLNEVKRHSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMSTKRNQGGQEDKENDKFPDQLSSNAISKRHSEFE : 116	
Celacanto	: --MKTTHSVAGIIVMLIQGSWQNPLODIENKSRFLKAANTEPIDEPRELTVKVRHSQGTFTSDYTKYLDTRAQDFVQWLMSTKRS----- : 85	
Tilápia 1	: -MKSITHSLAGILLVLFVQGSWQVPLRDADDSLSFESDNTL--NDEPVELSSMKRHSSEGTFSNDYSKYLEDRAQDFVRLMNNKRSQA-----AEK : 89	
Takifugu 1	: ---MRSSLAGILLLLGFIQNSWQVPLLETGSSSLAADDTL--QDDRELSNMKRHSSEGTFSNDYSKYLEDRAQDFVRLMNNKRSQA-----AEK : 87	
Peixe zebra 1	: -MKGQVYFASLLLLLVFVHKICVPLQGDSS--TSTETADSF--LARAPGLTMMKRHSSEGTFSNDYSKYLETTRAQDFVQWLMNAKRNNGG-----SVK : 86	
Tilápia 2	: --MNSAHSLAGLLLLLIQSSWQVDPQDTRHSMLLTENSI--LNEPIEIQNMKRHSSEGTFSNDYSKYLETTRAQDFVQWLMNKNKRNNG-----R : 85	
Takifugu 2	: --MNSAYSLAGLLLLFTTIQSSWQVPEQ--DRNSMLLNENSV--LTEPSELNMMKRHSSEGTFSNDYSKYLETTRAQDFVQWLMNKNKRNNG-----LFR : 86	
Peixe zebra 2	: --MVRIYAFIGLLLLLIQSSWQVPLQDTEENGSLMSSEDL--FNDRPREVNTMKRHSSEGTFSNDYSKYLETTRAQDFVQWLMNKNKRSQV-----PTR : 88	
Spotted gar	: --MKGIHSLAGLLLLIVQGSWQVPLQDTEENSRLLTEDSS--IDPRELTVNKRHSQGTFTSDYSKYLDTRAQDFVQWLMSTKRSQG-----ITR : 88	
Lampreia I	: --MSDAGFLAAPVLLLLLVLSASASLEQAASRD--DDSAERP-----LSKRHSSEGTFTSDYSKYLENKQAKDFVRLMNAKRG-----GSELQR : 80	
Lampreia II	: --MSNASGTLISYMFMLLGLTLASLVPHETDDGDLSAEIS-----LANRHSQGSFTSDYSKHLVDVQAKDFVTLNTRKRGVDAQ----- : 87	

	GLP1	GLP2	
Humano	: RHAEGTFS <del>SDVSSYLEGQAAKEFI</del> AWLVKGRRRDFPEEVAIV-EELGRRHADGSFSDSEMNTILDNLAARDFINWLIQT <del>KITDRK</del> ----- : 180		
Galinha	: RHAEGTYTSDITSYLEGQAAKEFI <del>AWLVNGR</del> RRDFPEKALMA-EEMGRRHADGFTSDINKILDDMAAKEFLKWLINTKVTQRDLLGEYQ- : 206		
Celacanto	: -----GFPNEISET-EGMDRRHADGSFTSDINKVLDTIAAKEFLNWLINSKDSQPRDPFSENQ : 142		
Tilápia 1	: RHAEGTFTSDVSSYLKQDAIKDFVARLKAGVRRRLRSETNRRVEAFNRHVDGFTSDVNVKVLDSMAAKEYLLWVMASKPSGERKKRQADQ- : 178		
Takifugu 1	: RHAEGTYTSDVSSYLKQDAIKDFVARLKAGVRRRLRSETNRRVEAFNRHVDGFTSDVNVKVLDSMAAKEYLLWVMASKPSGERKKRQADQ- : 179		
Peixe zebra 1	: RHAEGTYTSDVSSYLQDQAAKEFVSWLKTGRRRD--ANNKGANMAQRRHVDGFTSDVNVKVLDSIAAKEYLQWVMNSKASGTS <del>GKRGNGQ</del> : 176		
Tilápia 2	: RHAEGTYTSDVSSYLQDQAAKEFVSWLKTGRRRD----- : 120		
Takifugu 2	: RHAEGTYTSDVSSYLQDQAAKEFVSWLKTGRRRD----- : 121		
Peixe zebra 2	: RHAEGTYTSDVSSYLQDQAAKEFVSWLKTGRRRD----- : 123		
Spotted gar	: RHAEGTYTSDVSSYLQDQAAK <del>FVTLKQGR</del> RRDFSEESSETEEMYRR-HADGSFTSDVNVVLDIAAKEYFIWVMNSKPSSESEPFNV-- : 177		
Lampreia I	: RHAEGTFTNDMTSYLDAKAARDFVSWLARSRRRDGGDHLAENSEDKR-HAED-----VNALLDRMTAKTFIEWLEKQNSNDQAR----- : 161		
Lampreia II	: -----AGANLEKRHS <del>DSGFTSD</del> NMVMMLDRMSAKNFLEWLKQGRG----- : 120		

**Figura anexo 6. Alinhamento da sequência preditiva em aminoácidos da hormona GIP no humano, galinha, tilápia (sequência preditiva incompleta), peixe zebra e Peixe das cavernas. A sublinhado encontra-se a região do peptídeo sinal e a amarelo resíduos responsáveis pela interação com o recetor no humano.**

		<b>GIP</b>				
Humano	:	<u>MVATKTFALLLSLFLAVGLGEKKEGHFSALPSLPVGS</u> HAKVSSPQPRGPR	<u>LA</u>	<u>AGTFISDYSIAM_KIH_QD_TNN_LAG_CKKNQWKHNTQ</u>	REARALELASQANRKEEEAVEPQS : 117	
Galinha	:	-----MSLRVLSLLFAS-----LSFVLMEEENVSGLSIRTPGARPMHRR	SEATLASDY	SRTMDNMLKKNFVWLLARREKKS	DNVIEPYKREAEPEQLSAVSDQS-----L : 95	
Tilápia	:	-----SLLPHSEDEQDLRKR	AE	TIASEFSKIMDSM/QKNFVFLN/QREKKS	EPALTEALHGGLPGQAASAHGGGQ/QAGACGP : 50	
Peixe zebra	:	-MKAAMFALVLI	CLGSVW-----SSAGSQPLDSSIIHSSPNDIQKLSRR	AE	TIASDISKIVDSM/QKNFVFLN/QREKKS	EPALTEALHGGLPGQAASAHGGGQ/QAGACGP : 109
Peixe das cavernas:	:	-----DFCATNSPADDVQHLGRR	AE	TIASDISKIMDSM/QKNFVFLN/QREKKS	MPTMP-----E : 59	
Humano	:	SPAKNPSDELLRDLIIQELLACLLDQTNLCRLRSR-----			: 153	
Galinha	:	DPRSHEAKDFLAWLLKAKENQSSASLEGS	EDVKDVVN-----QEF	TWLMSTDLCRPRAA-----	: 150	
Tilápia	:	-----			: -	
Peixe zebra	:	QPEGEDPTQLGGDQVQADAH	PGGHPRQGGGERAGAEDHAGALRPGVQ	GP	DGEGSLGVQREGEVWRTEERADRAGRAGEATLRGHLQ	GPPEVRQQGVKRPCTPSHPPLSTASLRA : 224
Peixe das cavernas:	:	DPEVHIFNDLLTKDFTM	VHSGKDRSK-----		: 86	

**Figura anexo 7. Alinhamento da sequência prevista em aminoácidos do péptido GCRP na galinha, celacanto, tilápia, takifugu e *sptotted gar*.**

**GCRP**

Galinha	:	HSEGTFTSDFTRYLDKMKAKDFVHWLINT----	:	29
Celacanto	:	HSEGTFTSDFTRYLDKMKAKDFVRWLIST----	:	29
Tilápia	:	HSDGTFTSDFTHYLDKIKAKDFVEWLTGPKQE-	:	32
Takifugu	:	HSEGTFSHDFSRYLDKIKTKAFVEWLASTKER-	:	32
<i>Spotted Gar</i>	:	HSEGTFSDFTRYLDRIKAKDFVHWLQTGTKRQ	:	33