



Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO
Ponto Focal: Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Instituto de Química e Biotecnologia – IQB/UFAL
Doutorado Em Biotecnologia



MEIRIELLY KELLYA HOLANDA DA SILVA

***Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae) como modelo alternativo para estudo
da Síndrome Metabólica**

Maceió – AL

2020

MEIRIELLY KELLYA HOLANDA DA SILVA

***Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae) como modelo alternativo para estudo da Síndrome Metabólica**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Profº Drº Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Maceió - AL

2020

Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Biblioteca Campus Arapiraca - BCA
Bibliotecário Responsável: Márcio Thiago dos Santos Albuquerque
CRB - 4 / 2052

S586t Silva, Meirielly Kellya Holanda da
Tribolium castaneum (Coleóptera: Tenebrionidae) como modelo alternativo para estudo da Síndrome Metabólica / Meirielly Kellya Holanda da Silva. – Maceió, 2020. 153 f.: il.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO, Maceió, 2020.

Inclui bibliografias.
Apêndices: f. 151-153.

1. Bioquímica. 2. Bioenergética. 3. Insetos. 4. *Tribolium Castaneum*. I. Grillo, Luciano Aparecido Meireles, orient. II. Título.

CDU 577.2


Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Instituto de Química e Biotecnologia - Universidade Federal de Alagoas
Campus A. C. Simões – Av. Lourival Melo Mota, s/n° - Cidade Universitária
57072-970, Maceió- AL - Telefone: (82) 3214-1144 – E-mail: renorbioufal@gmail.com

ATA – DEFESA DE TESE

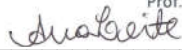
Ata de Defesa de Tese de Doutorado da aluna **Meirielly Kellya Holanda da Silva**. Aos treze (13) dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte (2020), às 9:01hs, reuniu-se remotamente via webconferência, a banca de Defesa de Tese composta por Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo - UFAL (Orientador), Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite – UFAL (Titular), Prof. Dr. David Majerowicz – UFRJ (Titular), Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino – UFAL (Titular) e Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira – UFAL (Titular), perante a qual **Meirielly Kellya Holanda da Silva**, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, defendeu, para preenchimento do requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, sua Tese intitulada “**Tribolium castaneum (Coleóptera: Tenebrionidae) como modelo alternativo para estudo da Síndrome Metabólica**”. A defesa da referida tese ocorreu, das 9:01 horas às 12:40 horas, tendo a doutoranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo para tal. Reunida em sessão fechada a banca emitiu parecer e concluiu por considerar a doutoranda APROVADA por sua tese e sua defesa terem, por unanimidade, recebido o conceito A.

Eu, Luciano Aparecido Meireles Grillo, que presidi a Banca de Tese, assino a presente ata junto aos demais membros da banca examinadora e dou fé. Em Maceió - AL, 13 de julho de 2020.

Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo


Prof. Dr. Luciano Aparecido M. Grillo
Coordenador PPGCF / UFAL
SIAPE 4663550
Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Coordenador do PPGCF/UFAL

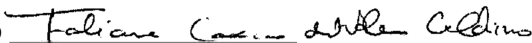
Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite


Coordenador do PPGCF/UFAL


Prof. Dr. David Majerowicz



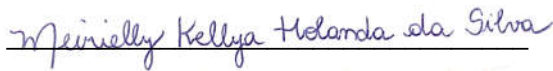
Profa. Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino



Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira



Discente: Meirielly Kellya Holanda da Silva



ADENDO:

À Deus por ter me abençoado. À minha família por ter me possibilitado. Aos meus amigos por terem me apoiado. Aos meus professores por terem concretizado.

Na graduação, me fizeram Enfermeira. No mestrado, me ensinaram a ser Professora. No Doutorado, me tornaram Pesquisadora.

A todos que me possibilitaram aprender e ser quem sou, eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Para além dos clichês, não há como não agradecer primeiramente a Deus por sempre me abençoar em todos os caminhos que decidi trilhar, me presenteando com anjos que trouxeram luz nos momentos de maior necessidade e com uma família e amigos lindos.

Aos meus pais, pelo apoio e exemplo de determinação e amor, ao meu esposo e filho por entenderem os momentos de ausência, à minha família pelo apoio incondicional, por terem vivido este sonho comigo. Agradeço em especial à minha mãe, Meu Lindo (companheiro do dia e amor da vida), tia Leida, Allisson (meu irmão, meu presente de Deus), vó Magali e minha sogra Antonieta, por terem interrompido suas ocupações para me ajudarem com Antony (meu eu fora de mim) e com a concretização do doutorado.

Ao meu professor e orientador Luciano Grillo, por ter me aceitado, mesmo sem me conhecer, por ter compreendido minhas limitações e sempre acreditar na capacidade de superá-las, por ter plantado o amor pela pesquisa e pelos insetos.

Ao LBM, uma família linda, por todo aprendizado e compartilhamento de alegrias e frustrações: Josiel, Thomás, Camilla, Luana, Larissa, Érika, Thays, Valéria, Robert, Camila e, principalmente, Mariana, por sua amizade, cumplicidade e paciência em cada PCR. Quero construir um laboratório igual ao nosso!

Aos laboratórios parceiros (e amigas construídas): Bioenergética (Prof^a Ana Catarina por possibilitar a construção de novos métodos, Ábner com sua paciência, Marcos e, principalmente, Reginaldo, por sua dedicação, horas de trabalho e amizade), LBCM (Prof. Daniel Gitaí, em especial à Mykaela e seu querido Jean, por todos os conhecimentos compartilhados), LABI (Prof^a Tamí Mott e Alex, por sua dedicação em inúmeras repetições), TecNano (Prof^a Camila Dornelas e Valcilane, por sua delicadeza em nossos almoços), LabTCon (Prof. Irinaldo Diniz), LAFA (Prof. Ticiano Gomes), Farmacognosia (Prof^a Sâmia Andrcia), aos amigos do LAMP, LINQA e por todos os laboratórios por onde passei e aprendi por meio de pessoas que me inspiraram.

Às amigas proporcionadas pelo doutorado, tornando as disciplinas e aprendizado mais leve: Viviane (e sua família linda), Érika, Fernanda, Luciana, Sabrina e Alice.

Aos amigos que a vida me concedeu: Grace, Fabiana, Jacqueline, Maria Gina, Sidney, Robsson, Felipe e Janaína, por escutarem minhas angustias e sempre apoiarem as decisões, por mais loucas que fossem. Às primas e irmãs do coração, pelo apoio e compreensão perante a distância e em particular, Nayara, por sua fé e torcida para a concretização deste sonho. Às amigas Wanessa, Isabella, Vanessa, Lia e Cíntia, seres de luz em minha vida.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO – UFAL) pela oportunidade de aprendizado. Ao CNPq, CAPES e FAPEAL pelo apoio financeiro. Ao ICF, IQB e ICBS pelas parcerias e oportunidades.

Agradeço a todos os professores que passaram por minha vida e sempre apoiaram e incentivaram este sonho, aos amigos que, mesmo estando distantes, contribuíram na construção da pessoa que sou e na idealização de todos os sonhos que desejo realizar.

*“Que os meus ideais sejam tanto mais fortes quanto
maiores foram os desafios, mesmo que precise
transpor obstáculos aparentemente intransponíveis.
Porque metade de mim é feita de sonhos e a outra
metade é de lutas”.*

(Vladimir Maiakóvski)

RESUMO

O *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), ou besouro vermelho de farinha, é considerado uma das principais pragas secundárias de grãos, com distribuição mundial, sendo responsável por grandes perdas econômicas. Algumas características deste inseto favorecem sua utilização como modelo em estudos transgeracionais, bioquímicos e genéticos, como rápida reprodução, alta fecundidade, intervalos curtos de geração, baixos custos de manutenção, facilidade na incorporação de fatores nutricionais na alimentação, aspectos éticos aceitáveis, tecidos observáveis e genoma disponível. Além disso, alguns insetos como *T. castaneum*, apresentam processo digestivo e metabolismo de lipídios análogos aos mamíferos, destacando-os como modelos para estudos metabólicos. Assim, esta tese apresenta o objetivo de estabelecer o inseto *T. castaneum* como modelo alternativo de baixo custo e alta eficácia para o estudo da Síndrome Metabólica e de fármacos utilizados nesta disfunção, conferindo-lhe uma aplicação biotecnológica por meio de diferentes abordagens utilizadas nos cinco capítulos apresentados. O primeiro capítulo trata-se de um apanhado teórico dos principais pontos abordados nesta tese. O segundo capítulo consta de uma prospecção tecnológica que objetivou analisar pedidos de depósitos de patentes e artigos referentes à utilização do *T. castaneum* como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídios, constatando que nenhum dos pedidos analisados se refere ao objeto deste estudo, conclui-se que esta é uma área tecnológica pouco explorada e potencialmente útil para novas pesquisas e produtos. Assim, o terceiro capítulo se refere ao desenvolvimento de um novo método de preparação destes insetos como modelo invertebrado de baixo custo e alta eficácia, para estudo da Síndrome Metabólica e do efeito de fármacos candidatos nesta disfunção, assim como o pedido de proteção patentária deste método inovador. Ao afirmar esta aplicabilidade, o quarto capítulo apresenta resultados experimentais que objetivaram analisar distúrbios bioenergéticos mitocondriais, através da produção de espécies reativas de oxigênio e das alterações bioquímicas e metabólicas causadas pela (in)flexibilidade metabólica. Para isso, larvas de *T. castaneum* foram mantidas em dieta rica em lipídios por 168 horas e, posteriormente, transferidas para dieta suplementada com fenofibrato a 1%. Identificou-se que óleo de oliva a 15% induziu hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e obesidade, alterações da Síndrome Metabólica, além de hiperinsulinemia e maior geração de espécies reativas de oxigênio, com consequente aumento da respiração mitocondrial (complexo II), como mecanismo compensatório. Por outro lado, a suplementação com fenofibrato restaurou as disfunções metabólicas para um nível próximo ao observado no grupo controle. De forma semelhante, o último capítulo apresenta uma análise da Bioinformática, destacando, entre os insetos, o modelo emergente *T. castaneum* como mais apropriado para estudar a função conservada dos miRs. Isto se deve ao fato de que este inseto possui uma sequência madura homóloga ao *Homo sapiens* (miR-33a) e, na análise filogenética, está evolutivamente mais próximo do homem quando comparada às drosófilas, além de apresentar genes alvos similares ao miR-33 em humanos. Desta forma, os cinco capítulos cercam a Síndrome Metabólica (pela bioenergética mitocondrial ou miR-33) e usam *T. castanum* como modelo de baixo custo e alta efetividade para pesquisas, vislumbrando esta aplicabilidade biotecnológica como uma alternativa bioética e econômica, que possibilite avançar em pesquisas e alcançar resultados que causem impactos positivos e contribuam para redução da incidência global desta disfunção.

Palavras-chave: Bioenergética. Bioquímica. Bioinformática. miR-33. Insetos.

ABSTRACT

Tribolium castaneum (Coleopter: Tenebrionidae), or red flour beetle, is considered one of the main secondary pests of grains, with worldwide distribution, being responsible for great economic losses. Some characteristics of this insect favor its use as a model in transgenerational, biochemical and genetic studies, such as rapid reproduction, high fertility, short generation intervals, low maintenance costs, ease in incorporating nutritional factors into the diet, acceptable ethical aspects, observable tissues and genome available. In addition, some insects such as *T. castaneum*, have a digestive process and lipid metabolism analogous to mammals, highlighting them as models for metabolic studies. Thus, this thesis aims to establish the insect *T. castaneum* as an alternative model of low cost and high effectiveness for the study of Metabolic Syndrome and drugs used in this dysfunction, giving it a biotechnological application through different approaches used in the five presented chapters. The first chapter is a theoretical overview of the main points addressed in this thesis. The second chapter consists of a technological survey that aimed to analyze patent applications and articles referring to the use of *T. castaneum* as an experimental model for studies in carbohydrate and lipid metabolism, noting that none of the analyzed applications refers to the object of this study, it is concluded that this is a technological area little explored and potentially useful for new research and products. Thus, the third chapter refers to the development of a new method of preparing these insects as an invertebrate model of low cost and high efficiency, for the study of the Metabolic Syndrome and the effect of candidate drugs in this dysfunction, as well as the application for patent protection of this method innovative. In affirming this applicability, the fourth chapter presents experimental results that aimed to analyze mitochondrial bioenergetic disorders, through the production of reactive oxygen species and the biochemical and metabolic changes caused by metabolic (in)flexibility. For this, *T. castaneum* larvae were kept on a diet rich in lipids for 168 hours and, later, transferred to a diet supplemented with 1% fenofibrate. It was identified that 15% olive oil induced hyperglycemia, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and obesity, changes in Metabolic Syndrome, in addition to insulin resistance and greater generation of reactive oxygen species, with a consequent increase in mitochondrial respiration (complex II), such as compensatory mechanism. On the other hand, supplementation with fenofibrate restored metabolic disorders to a level close to that observed in the control group. Similarly, the last chapter presents an analysis of Bioinformatics, highlighting, among the insects, the emerging model *T. castaneum* as more appropriate to study the conserved function of miRs, since this insect has a mature sequence homologous to *Homo sapiens* (miR -33a) and, in phylogenetic analysis, it is evolutionarily closer to man when compared to drosophila, in addition to presenting target genes similar to miR-33 in humans. In this way, the five chapters surround the Metabolic Syndrome (through mitochondrial bioenergetics or miR-33) and use *T. castanum* as a low cost and high effectiveness model for research, envisioning this biotechnological applicability as a bioethical and economic alternative, which makes it possible to advance in research and achieve results that cause positive impacts and contribute to reducing the overall incidence of this dysfunction.

Keywords: Bioenergetics. Biochemistry. Bioinformatics. miR-33. Insects.

SUMÁRIO

1	Introdução	10
	Referências	13
2	Objetivos	14
3	<i>Tribolium castaneum</i> e Síndrome Metabólica: perspectivas e desafios ..	15
3.1	<i>Tribolium castaneum</i> : o modelo	15
3.2	Síndrome Metabólica	27
3.3	Bioenergética mitocondrial	30
3.4	Fenofibrato: um estimulante da lipólise	40
3.5	miR-33 e metabolismo lipídico	42
	Referências	46
4	<i>Tribolium castaneum</i> como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídeos: uma prospecção tecnológica ..	57
4.1	Introdução	57
4.2	Metodologia	59
4.3	Resultados e Discussão	60
4.4	Conclusão	72
	Referências	72
5	Método de preparação do inseto <i>Tribolium castaneum</i> (Coleoptera: Tenebrionidae) como modelo de baixo custo para estudo da Síndrome Metabólica	75
5.1	Título da invenção	75
5.2	Objeto da invenção	75
5.3	Problema que a invenção se propõe a resolver	75
5.4	Campo de atuação	77
5.5	Estado da técnica	77
5.6	Descrição da técnica	80
5.7	Resultados obtidos	86
5.8	Vantagens da patente	94
5.9	Resumo	95
5.10	Reivindicações	96
5.11	Palavras chave	96
5.12	Fontes de financiamento	96
5.13	Inventores	96
6	A bioenergética mitocondrial é comprometida pela inflexibilidade metabólica induzida por dieta <i>high fat</i> em larvas de <i>Tribolium castaneum</i>	98
6.1	Introdução	99
6.2	Materiais e Métodos	100
6.3	Resultados e Discussão	105
6.4	Conclusões	116
6.5	Agradecimentos	117

	Referências	117
	Material suplementar	120
7	miR-33 and lipid metabolism: focus on insects as a model	121
7.1	Introduction	122
7.2	Materials and Methods	122
7.3	Results and Discussion	124
7.4	Conclusion	137
	References	137
	Supplementary Material.....	141
8	Conclusões	149
	Apêndice A – Publicação da prospecção teconológica	151
	Apêndice B – Protocolo do depósito da patente no INPI	152
	Apêndice C – Comprovante de submissão do Artigo: miR-33 and lipid metabolism: focus on insects as a model	153

1 Introdução

1 Introdução

O *Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae), também conhecido como besouro vermelho da farinha devido sua coloração castanho-avermelhada, é considerado uma das principais pragas secundárias de grãos armazenados, principalmente de cereais como milho, arroz e trigo, com distribuição mundial, sendo responsável por grandes perdas econômicas no setor de produtos (FARONI; FRABETTI, 2009; SCHMIDT-OTT; LYNCH, 2016).

Algumas características deste inseto, como rápida reprodução, alta fecundidade, intervalos curtos de geração, baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis e tamanho reduzido, com tecidos observáveis em todos os estágios de desenvolvimento e genoma disponível (RICHARDS et al., 2008), favorecem estudos transgeracionais, bioquímicos e genéticos. Destaca-se também a facilidade na incorporação de fatores nutricionais na alimentação do *T. castaneum*, colocando-o em posição de destaque para os testes *screening* (GRÜNWARD et al., 2013).

Além disto, insetos apresentam processo digestivo e o metabolismo de lipídios com características análogas aos mamíferos (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007; GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003), destacando-os como modelos para estudos metabólicos. Embora a manipulação dos tecidos deste inseto apresente dificuldades por serem pequenos, necessitando do auxílio de lentes, sua utilização como modelo alternativo atende à um desafio emergente, a substituição de modelos vertebrados, devido às relevantes questões éticas e altos custos na manutenção, para modelos invertebrados, como insetos (INSUA et al., 2013).

Esta necessidade se encontra em consonância com as determinações de instituições regulamentadoras nacionais (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA) e internacionais (agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* - FDA), que buscam soluções alternativas para o uso

de animais vertebrados de pequeno ou médio porte, como modelo de *screening* em teste pré-clínicos. Assim, este estudo apresenta uma aplicação biotecnológica para este inseto praga, estabelecendo-o como modelo alternativo de baixo custo para estudos das disfunções metabólicas e bioenergéticas induzidas pela Síndrome Metabólica, assim como para análise dos efeitos de fármacos utilizados nesta disfunção.

Nesta perspectiva, os resultados desta tese divide-se em capítulos, o primeiro destes, ***Tribolium castaneum* e Síndrome Metabólica: perspectivas e desafios**, refere-se a um apanhado teórico dos principais pontos abordados neste estudo, resgatando, inicialmente, aspectos fisiológicos deste besouro, que o destaca entre os demais insetos nas pesquisas metabólicas. Esta revisão se debruça também sobre a Síndrome Metabólica, abordando sua epidemiologia e causas, com enfoque na flexibilidade metabólica e disfunções mitocondriais, sendo esta última de maior relevância, tanto que recebeu atenção maior em um tópico específico. Sobre as perspectivas terapêuticas, indaga-se sobre o fenofibrato, um fármaco com possibilidade de minimizar as disfunções mitocondriais causadoras da síndrome central deste estudo. Por fim, o enfoque se volta para o grande desafio desta tese, o miR-33, trazendo uma abordagem inicial sobre esta pequena molécula reguladora de um grande distúrbio como a Síndrome Metabólica.

Ao propor uma aplicabilidade biotecnológica para este inseto, o capítulo ***Tribolium castaneum* como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídeos: uma prospecção tecnológica** tem por objetivo analisar pedidos de depósitos de patentes referentes à utilização do *Tribolium castaneum* como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídios, por meio de patentes das bases de dados PatentEscope e Espacenet, e artigos científicos do PubMed. A importância deste estudo é identificar se já existe algum método que utilize este inseto como modelo de baixo custo para estudos metabólicos, identificando, portanto, lacunas biotecnológicas que podem ser exploradas com potencialidade para novas pesquisas e produtos.

De forma contínua, o capítulo **Método de preparação do inseto *Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae) como modelo de baixo custo para estudo da Síndrome Metabólica** constitui o pedido de depósito de patente em que se estabelece um método inovador de preparo do inseto praga *T. castaneum* como modelo de baixo custo e alta eficiência para o estudo de distúrbios metabólicos, com destaque para a Síndrome Metabólica. Além de descrever um atual problema, que é o uso de vertebrados para tais estudos, com graves implicações éticas e elevados custos econômicos, este pedido apresenta a descrição do método proposto, os resultados obtidos que, extrapolam a fisiopatologia desta síndrome e avança para

a utilização deste modelo invertebrado na *screening* de fármacos amplamente usados neste distúrbio, como o estimulante da lipólise, fenofibrato. Assim, a partir dos resultados defendidos por esta proteção biotecnológica, se erguem os pilares metodológicos para os capítulos seguintes.

O Capítulo **A bioenergética mitocondrial é comprometida pela inflexibilidade metabólica induzida por dieta *high fat* em larvas de *Tribolium castaneum*** trata de um artigo contendo os resultados de pesquisas experimentais que teve como objetivo principal analisar as disfunções mitocondriais geradas a partir da inflexibilidade metabólica provocada pela suplementação de dieta hiperlipídica em larvas de *T. castaneum* observando, para isto, a formação de espécies reativas de oxigênio e o metabolismo das larvas. Analisou-se também se a adição de um estimulante da lipólise, o fenofibrato, possui a capacidade de restaurar o metabolismo à sua normalidade, inferindo, assim, sobre a dinâmica mitocondrial, que pode apresentar função promotora ou protetora de distúrbios metabólicos.

Finalmente, o Capítulo **miR-33 and lipid metabolism: focus on insects as a model** trata de uma análise de Bioinformática acerca do miR-33, que apresenta regulação negativa de vários componentes da Síndrome Metabólica. Diante da relevância deste miR para disfunções metabólicas, o objetivo desta revisão foi propor insetos como modelos alternativos para estudos da associação entre o miR-33 e o metabolismo lipídico, com foco especial no modelo em ascensão, o *T. castaneum*, trazendo informações que destacam este inseto como modelo invertebrado ideal para análise dos miRs, devido à conservação evolutiva desta espécie, além de identificar genes alvos similares aos humanos. Apesar da não realização de estudos experimentais, os resultados obtidos nesta análise de Bioinformática fornecem o alicerce para pesquisas futuras, no intuito de contribuir para a identificação de alternativas preventivas, diagnósticas e/ou terapêuticas da Síndrome Metabólica.

Assim, estes capítulos circundam a Síndrome Metabólica e a utilização do *T. castaneum* como modelo de baixo custo e alta efetividade para pesquisas, em substituição aos modelos vertebrados, permeados por graves questões éticas e elevados custos, vislumbrando esta aplicabilidade biotecnológica como uma alternativa bioética e econômica, que possibilite avançar em pesquisas e alcançar resultados que causem impactos positivos e contribuam para redução da incidência global desta disfunção.

REFERÊNCIAS

FARONI, L. R.; FRABETTI, D. R. **Principais pragas de grãos armazenados**. Net, Minas Gerais, out. 2009. Disponível em: <http://www.centreinar.org.br>. Acesso em: 10 jun. 2018.

GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 37, p. 579-588, 2007.

GRILLO, L. A. M.; PONTES, E. G.; GONDIM, K. C. Lipophorin interaction with the midgut of *Rhodnius prolixus* : characterization and changes in binding capacity. **Insect Biochem Mol Biol**. v. 33, p. 429–438, 2003.

GRÜNWALD, S.; STELLZIG, J.; ADAM, I. V. et al. Longevity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* is enhanced by broccoli and depends on nrf-2, jnk-1 and foxo-1 homologous genes. **Genes & Nutrition**. v. 8, p. 438-448, 2013.

SCHMIDT-OTT, U.; LYNCH, J. A. Emerging developmental genetic model systems in holometabolous insects. **Curr Opin Genet Dev**. v. 39, p. 116–128, 2016.

RICHARDS, S.; et al. *Tribolium* genome sequencing consortium. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**. v. 452, p. 949–955, 2008.

2 Objetivos

Objetivo Geral:

Estabelecer o inseto *Tribolium castaneum* como modelo alternativo de baixo custo e alta eficácia para o estudo da Síndrome Metabólica e de fármacos utilizados nesta disfunção.

Objetivos específicos:

- Avaliar o mercado biotecnológico no que se refere à utilização do *T. castaneum* como modelo experimental para estudos do metabolismo de lipídeos e carboidratos por meio de uma prospecção tecnológica;
- Desenvolver um método inovador de preparação de insetos *T. castaneum* como modelo invertebrado de baixo custo e alta eficácia para estudo da Síndrome Metabólica e do efeito de fármacos candidatos nesta disfunção, além de protegê-lo por meio de pedido de proteção patentária;
- Analisar a bioenergética mitocondrial, as alterações bioquímicas e metabólicas em larvas de *T. castaneum* induzidas à uma condição de inflexibilidade metabólica, causada pelo suprimento de uma dieta *high fat*, além de analisar os efeitos da suplementação com um estimulante da lipólise, o fenofibrato, sobre tais disfunções.
- Propor insetos, em especial o *Tribolium castaneum*, como modelo alternativo para estudo da associação entre miR-33 e metabolismo lipídico por meio de uma análise de Bioinformática.

***Tribolium castaneum* e Síndrome Metabólica: perspectivas e desafios**

3.1 *Tribolium castaneum*: o modelo

Inseto como modelo experimental

Os insetos constituem a forma de vida animal mais abundante no planeta, com cerca de um milhão de espécies organizadas em aproximadamente 800 famílias e distribuídas em 32 ordens, é o grupo mais numeroso dos artrópodes e compreendem cerca de 70 % de todas as espécies animais conhecidas (HOY, 1994; CHOWANSKI et al., 2017).

O sucesso desta adaptação se baseia, principalmente, no fato de alguns insetos serem holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa: ovo, larva, pupa (ou crisálida) e adulto (CISNE, 1974). Outra característica importante é a presença de asas, possibilitando aos insetos a conquista dos ambientes mais diversos, permitindo maior eficiência na busca do alimento e defesa contra predação, além de garantir o fluxo gênico das espécies através da migração. A tais características, soma-se o fato de que os insetos possuem rápida reprodução e ciclos de vida curtos, facilmente acompanhados em todos os seus estágios, além de serem pequenos, favorecendo a manipulação de seus órgãos. Devido a isto, os insetos se tornam um importante modelo para estudos experimentais (MARANHÃO, 1977).

Outra vantagem refere-se à existência de um sistema nervoso menos complexo, conferindo-lhes maior resistência às intervenções cirúrgicas. Assim, os insetos constituem um grupo de escolha para diversos tipos de estudos, dentre eles, genéticos, bioquímicos, celulares e moleculares (GRILLO, 2005).

Várias pesquisas utilizaram insetos como modelos experimentais aos quais foram posteriormente observados em mamíferos. Dentre os quais pode-se destacar a observação do processo de seleção natural em mariposas (*Biston betularia*) (FISHER, 1933); a identificação do processo de endocitose mediada por receptores (ROTH; PORTER, 1964; TELFER, 1960 e 1961); a elucidação do mecanismo de ação de hormônios esteróides através de experimentos

com ecdisona (SCHELLER; KARLSON, 1977); a descoberta das secropinas, peptídeos antibacterianos (BOMAN; HULTMARK, 1987) e citocromo C (KEILIN, 1966); estudos com *Drosophila melanogaster*, onde através da biologia molecular identificou-se genes *homeobox* responsáveis por determinar o padrão de organização dos eixos corporais e sua homologia com vertebrados (AKAM, 1989) e estudos genéticos e moleculares que apontaram os locais do Sistema Nervoso Central relevantes para comportamentos sexuais masculinos (DEMIR; DICKSON, 2005; SAKAI; KITAMOTO, 2006).

Um dos principais modelos em estudos de citogenética é a *Drosophila melanogaster*, proporcionando o conhecimento de conceitos básicos e úteis de mecanismos que controlam o crescimento e a divisão celular em tecidos em desenvolvimento, como a demonstração da localização dos genes nos cromossomos (MORGAN, 2007). Sua ampla utilização se deve, em parte, ao fato de possuírem 289 genes ortólogos aos genes humanos responsáveis por doenças. Isto é comprovado através da *FlyBase*, uma base que consolida cerca de 800 trabalhos que descrevem a relação de doenças humanas específicas com genes da *D. melanogaster*, indicando a conservação de várias vias metabólicas e de sinalização entre estas espécies (ORIEL; LASKO, 2018).

Além da *Drosophila*, insetos como o *Bombyx mori*, *T. castaneum*, *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* também têm sido utilizados em estudos de sequenciamento e clonagem gênica. Além disto, organismos mutantes destas espécies já foram aplicados para estudos da análise de função dos genes e seus principais reguladores na Síndrome Metabólica e comorbidades, como doenças cardíacas, com perspectiva para aplicação dos resultados em humanos (FRASER, 2012). Em pesquisas de biologia molecular, o *T. castaneum* apresenta um padrão de evolução bastante resistente que sugere uma maior representatividade no conteúdo e função dos genes em comparação à *D. melanogaster* (RICHARDS et al., 2008). Tais descobertas tem destacado o *T. castaneum* nas pesquisas em genética, perdendo apenas para *D. melanogaster*, que lidera a escolha de sistemas modelo (BENTON; PAVLOPOULOS, 2014).

De forma semelhante, pesquisas com *Rhodnius prolixus*, o inseto hematófago considerado o principal vetor da Doença de Chagas, apresentaram importantes resultados na compreensão do metabolismo lipídico em insetos, elucidando aspectos do transporte lipídico através da lipoproteína Lipoforina (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007; GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003; MAJEROWICZ et al., 2017). Além destes avanços, a facilidade em utilizar o *R. prolixus* também se deve ao sequenciamento do seu genoma (MESQUITA et al., 2015), o que possibilita o estudo dos mecanismos adaptativos do inseto e a descoberta de novos alvos para controle biológico.

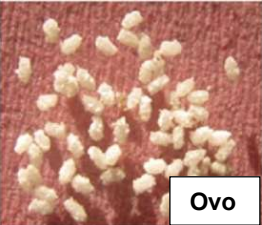



Diante da necessidade de substituição de modelos vertebrados (INSUA et al., 2013), é crescente número de pesquisas utilizando insetos como modelo alternativo baseia-se em suas características favoráveis, pois, além de representar uma classe significativa no reino animal, várias espécies apresentam rápida reprodução, alta fecundidade, ciclos de vida curtos que permitem rápidos intervalos de geração, o que facilita os estudos transgeracionais. O fato de serem pequenos favorece a manipulação de seus órgãos, além de possuírem baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis e efeitos sistêmicos e de fácil investigação do RNA de interferência (RNAi), possibilitando o silenciamento gênico. Outro ponto favorável é o genoma acessível em banco de dados para algumas espécies, como é o caso do *T. castaneum*, considerado modelo emergente, com sequências de genes que apresentam intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos (RICHARDS et al., 2008; GRÜNWARD et al., 2013).

***Tribolium castaneum* como modelo**

Considerado uma das principais pragas secundárias de grãos armazenados, principalmente de cereais como milho, arroz e trigo, com distribuição mundial, o *T. castaneum* é responsável por grandes perdas econômicas no setor de produtos (FARONI; FRABETTI, 2009; SCHMIDT-OTT; LYNCH, 2016). Sua evolução bem sucedida permitiu desenvolver um órgão semelhante ao rim em mamíferos, possibilitando a sobrevivência em ambientes extremamente secos, além de adquirir resistência a todas as classes de inseticidas usados contra ele. Sua estrutura física apresenta élitro que coordenam precisamente o vôo com asas dobráveis proporcionando proteção (ZOHRY; EL-SAYED, 2019).

O *T. castaneum*, também conhecido como besouro vermelho da farinha devido sua coloração castanho-avermelhada, é um inseto holometábolo, ou seja, passa por metamorfose completa em seu desenvolvimento (Tabela 1). O ciclo de vida médio deste inseto compreende 30 a 40 dias, quando em condições ideais: umidade relativa de 76,5 % e temperatura máxima de 30,6 ° C (DEVI; DEVI, 2015).

Tabela 1 - Descrição das fases de desenvolvimento do *T. castaneum* sob condições ideais.

<i>Fase de desenvolvimento</i>	<i>Aspecto</i>	<i>Forma</i>	<i>Tempo no ciclo</i>
 Ovo	Branco, microscópicos e muitas vezes unidos a pedaços de farinha	Oval 0,6 x 0,3 mm de comprimento	4 a 7 dias
 Larva	Amarelo cremoso	Espessura fina de até 5 mm com duas projeções pontilagudas escuras no último segmento do corpo	2 a 3 semanas
 Pupa	Claras, brancas a amareladas	Parecem estar com crostas e pode ser sexada	5 a 8 dias
 Adulto	Castanho avermelhado	Corpo curvo, com lados achatados, medem cerca de 3-4 mm	Algumas semanas

Fonte: adaptado de BALDWIN; FASULO, 2003; DEVI; DEVI, 2015.

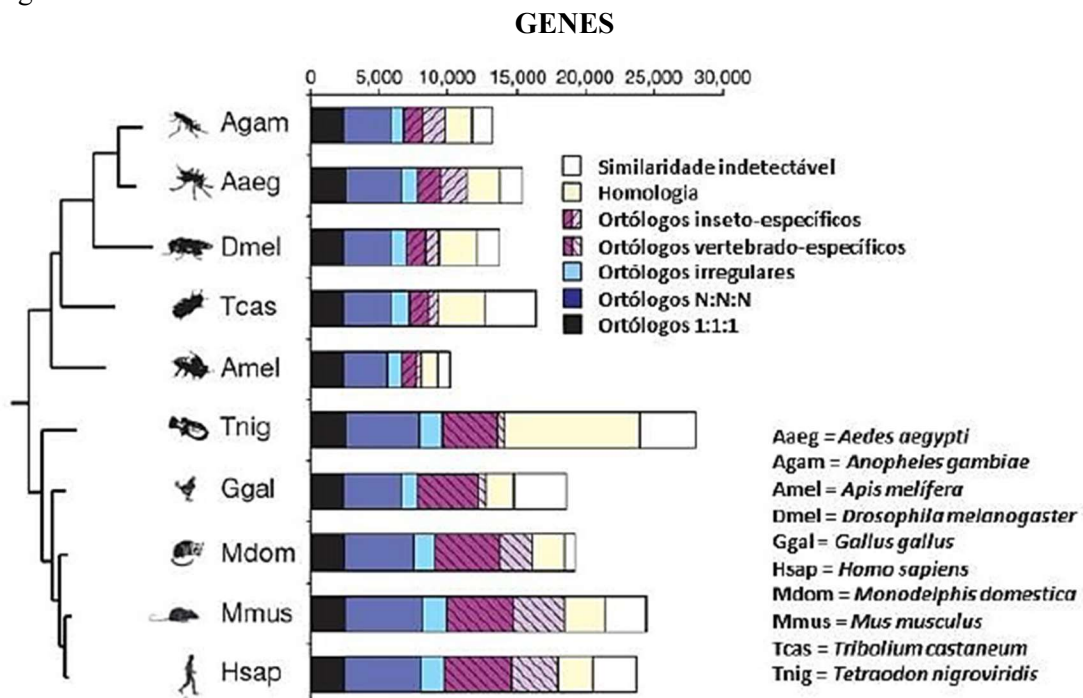
As larvas de *T. castaneum* possuem o último segmento abdominal com uma bifurcação, passando por 7 instares, em média, até chegarem à fase de pupa. A pupa tem olhos totalmente desenvolvidos, não têm um casulo e nos primeiros dias é branca e, gradualmente, passa para a cor amarela até, finalmente, chegar à cor castanha. Cada fêmea adulta pode colocar de 150 a 600 ovos, a 25 ° C e 32 ° C, respectivamente, com uma média de 6 ovos por dia durante 2 meses (BALDWIN; FASULO, 2003).

Este inseto foi o primeiro besouro a ter o genoma sequenciado, em 2008, por Richards e colaboradores, colocando-o como modelo promissor para estudos gênicos (RICHARDS et al., 2008). Outra característica favorável ao *T. castaneum* é a intensa relação de homologia de genes com outras espécies, incluindo humanos. A partir da comparação do conteúdo gênico entre insetos e vertebrados, observou-se que mais de 47 % dos seus genes (7.579 genes) apresentam relações ortogênicas rastreáveis entre insetos e vertebrados, sendo 15 % (2.403 genes) ortólogos universais de cópia única presente em todos os vertebrados, e apenas 9 %

(1.462 genes) que representam ortólogos específicos do inseto (Figura 1). A partir destes dados, publicados por Richards e colaboradores (2008), evidenciou-se o compartilhamento de 126 grupos de genes ortólogos entre *T. castaneum* e humanos.

A importante homologia fundamentada pelo estudo filogenético realizado por Richards et al. (2008), demonstrou que a evolução do *T. castaneum* exibiu um ramo mais curto quando comparado à *Drosophila* e *Anopheles*, indicando uma evolução moderada dessa espécie. Isso implica num conjunto de diferentes genes ancestrais, os quais podem fornecer *insights* sobre a função de seus ortólogos de vertebrados, diferente da *Drosophila*, que apresentou taxa de evolução mais elevada e por isso maior perda gênica evolutiva. Devido à alta homologia observada entre o *T. castaneum* e humanos, e o alto grau de conservação em sequências com domínios característicos de famílias de proteínas, muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando este inseto como modelo, a exemplo de estudos de interação entre fatores nutricionais e expressão gênica, utilizando genes homólogos (RICHARDS et al., 2008),

Figura 1 - Análise de genes ortólogos de um conjunto de 16.404 genes de espécies de insetos (*D. melanogaster*, *A. gambiae*, *A. aegypti*, *T. castaneum*, *A. mellifera*) e vertebrados (*H. sapiens*, *M. musculus*, *M. domestica*, *G. gallus*, *T. nigroviridis*). Análise filogenética por máxima verossimilhança com o alinhamento múltiplo concatenado de 1.150 ortólogos de cópia única universal presentes em todos os organismos estudados.



Fonte: Adaptado de RICHARDS et al., 2008.

Além dos pontos favoráveis já citados, destaca-se também a facilidade na incorporação de fatores nutricionais na alimentação do *T. castaneum*, colocando-o em posição de destaque

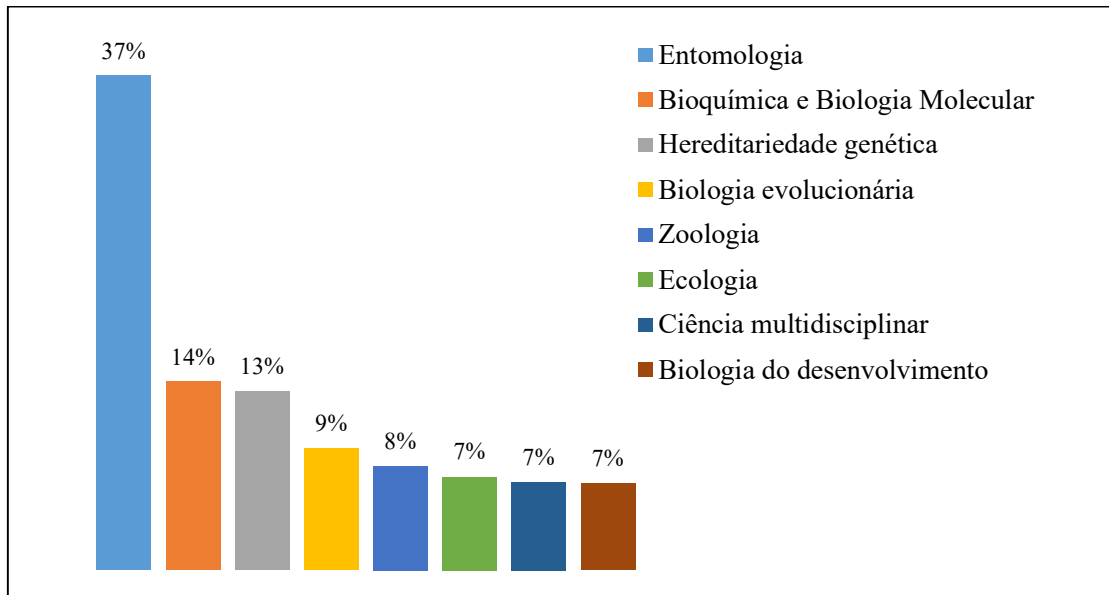
para os testes *screening* (GRÜNWALD et al., 2013). Ao apresentar as características favoráveis já descritas pertencentes aos insetos, o *T. castaneum* também se destaca em estudos transgeracionais como o desenvolvido por Bingsohn, Knorr e Vilcinskas (2016), que utilizaram este modelo para determinar os efeitos colaterais epigenéticos transgeracionais causados pelo ácido psicoativo valpróico, que é um inibidor da histona desacetilase, e a curcumina, um antioxidante inibidor da histona acetiltransferase. Os resultados foram além dos encontrados em modelos vertebrados e ensaios clínicos em humanos, indicando efeitos transgeracionais mais duradouros de ambos os fármacos, sugerindo, assim, o *Tribolium* como um modelo ideal de alerta precoce para indicar potenciais fatores de riscos epigenéticos transgeracionais associados aos fármacos.

A intrínseca relação de homologia gênica entre *T. castaneum* e vertebrados, como humanos, pode ser comprovada por estudos como o de Yu et al. (2013), que caracterizaram neste inseto a presença de neuropeptídeos homólogos aos mamíferos (Sulfaquinina), como a gastrina/colecistoquinina, elucidando aspectos envolvidos no controle da ingestão de alimentos.

Além disso, a disponibilidade da sequência genética deste inseto permitiu também o estudo sobre o envolvimento do gene quitina sintase 1 (CS1) na resistência desta praga agrícola aos fungos entomopatogênicos (HAYAKAWA et al., 2017). Através de técnicas de biologia molecular em *T. castaneum* foram identificados altos níveis de expressão de receptores de serotonina do tipo 5-HT7 no cérebro, representando possível envolvimento em processos neuronais (VLEUGELS et al., 2014).

Todas essas características deste inseto têm o colocado como importante modelo experimental. Comprova-se tal informação pela observação do número de artigos indexados na base de dados *Web of Science* disponíveis com o descritor “*Tribolium castaneum*” até junho de 2020, oferecendo um total de 5.816 publicações, distribuídas em diversas áreas do conhecimento, como demonstra a Figura 2. Entomologia ocupa a primeira área de pesquisa (2.181 artigos), demonstrando a importância deste inseto como praga de grãos com forte impacto econômico e a dificuldade em encontrar meios efetivos de controle, visto sua alta resistência. Observa-se também que Biologia Molecular e Bioquímica (820 artigos) ocupa o segundo lugar, seguido por Genética Hereditária (779 artigos), comprovando que o *T. castaneum* é um modelo emergente para esta área de estudo.

Figura 2 - Principais áreas de pesquisa dos artigos indexados na base *Web of Science* com busca pela palavra chave “*Tribolium castaneum*”, realizada em 2020.



Fonte: Autores, 2020.

Características fisiológicas dos insetos também contribuem para sua posição privilegiada em relação aos modelos experimentais, podemos destacar seu sistema nervoso com menor complexidade, facilitando intervenções cirúrgicas (GRILLO, 2005). Sendo necessário, portanto, a compreensão da fisiologia deste inseto, para entender de que forma tais características são favoráveis a determinados estudos.

Os insetos apresentam um sistema circulatório totalmente aberto, onde a hemolinfa corre livremente no interior da cavidade corporal. A circulação é facilitada por órgãos tubulares pulsáteis, coração e vasos dorsais. A hemolinfa se constitui de água, sais inorgânicos, materiais nitrogenados, ácidos orgânicos, carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas, pigmentos, gases e hemócitos (MUTTKOWSKI, 1923; SNODGRASS, 1993; GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003).

Seu sistema respiratório é formado por vários poros localizados no tórax e abdômen, ligados aos tubos quitinizados (as traquéias) espalhados por toda a cavidade corporal dos insetos, levando o oxigênio a todos seus órgãos (LAW; WELLS, 1989). Apesar de tais diferenças, os insetos apresentam semelhanças em relação aos vertebrados, tais como suas funções corporais reguladas por hormônios.

Além da sua estrutura corporal, outro fator que influencia na ótima adaptação deste inseto é sua capacidade de desenvolver-se em ambientes secos. Isto se deve à presença de Túbulos de Malpighi na região retal, com capacidade para reabsorção praticamente completa

da água. Os Túbulos de Malpighi permitem, além de uma perfeita osmorregulação, a capacidade de adaptação deste inseto, justificando assim a resistência e seu grande potencial adaptativo a um expressivo número de inseticidas (LAW; WELLS, 1989).

Pesquisa sobre o metabolismo lipídico de *Rhodnius prolixus* (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM; 2007) elucidou pontos sobre o processo digestivo e metabolismo de lipídios em insetos, inferindo que tais mecanismo ocorrem de forma análoga à dos mamíferos. Tal informação, associada às características específicas do *Tribolium castaneum*, colocam-no como modelo experimental ideal para estudos do metabolismo de lipídios e de distúrbios, como a Síndrome Metabólica. Tal afirmação baseia-se no fato de que manifestações clínicas desta síndrome, como obesidade, hiperglicemia e hipertrigliceridemia (VIDIGAL et al., 2013) podem ser induzidas e analisadas neste inseto.

Metabolismo dos lipídios em insetos

Os insetos são incapazes de sintetizar alguns metabólitos e precisam adquirir outros nutrientes através da alimentação (BEHMER; ELIAS; GREBENOK, 1999), sendo o triacilglicerol (TAG) o principal componente lipídico da dieta e a forma em que são estocados os ácidos graxos utilizados para a homeostase energética (BEENAKKERS; VAN DER HORST; VAN MARREWIJK, 1985) e períodos de não alimentação de insetos holometábolos (ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM, 2012), como o *T. castaneum*. A digestão, absorção e transporte dos lipídios da dieta em insetos ocorre, essencialmente, no intestino médio (TURUNEN; CRAILSHEIM, 1996), sendo um processo bastante semelhante ao dos vertebrados (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007).

Os triacilgliceróis provenientes da dieta sofrem hidrólise por ação da enzima triacilglicerol-lipase (TAG-lipase), gerando duas vias de produtos possíveis: (i) ácidos graxos livres (AGL) e glicerol ou (ii) monoacilglicerol (MAG) e AGL (GONDIM et al., 2018). Porém, supõe-se que, em geral, ocorra sua hidrólise formando MAG + AGL.

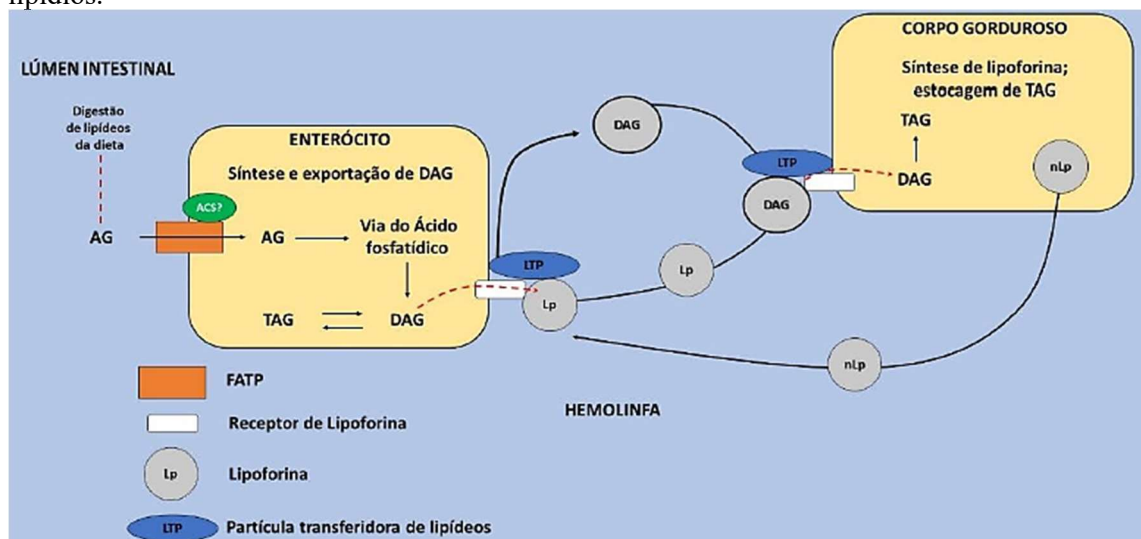
Os ácidos graxos serão absorvidos através dos enterócitos, no intestino médio, entrando então, em rotas metabólicas específicas, em consequência da demanda energética do organismo. Ainda nos enterócitos, os ácidos graxos de cadeia longa são ativados ao acil-CoA correspondente para que possam ser utilizados em vias metabólicas e essa ativação é feita pela adição de uma molécula de coenzima A, reação catalisada por enzimas da família acil-CoA sintetase (ACS) (GREVENGOED; KLETT; COLEMAN, 2014; ALVES-BEZERRA et al., 2015).

Em insetos, esta ativação pode ser realizada por proteínas transportadoras que possuem atividade intrínseca de acil-CoA sintase (FATP/ACSVL), porém, tal mecanismo ainda não está completamente elucidado (DOURLEN et al., 2015; ALVES-BEZERRA et al., 2015). As proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP/ACSVL) são proteínas de membrana que fazem o transporte de ácidos graxos de cadeia longa (LCFA) para o citoplasma, compostos que são a principal fonte de energia das células (BEENAKKERS et al., 1985; CHINO et al., 1981).

Os ácidos graxos da dieta, nos enterócitos, são convertidos em diacilglicerol para então serem transportados das células intestinais, através da hemolinfa, até o corpo gorduroso ou até tecidos para utilização imediata, por uma lipoproteína de alta densidade chamada lipoforina (Lp), que é sintetizada no corpo gorduroso (BEENAKKERS et al., 1985; CHINO et al., 1981). Na Figura 3 pode-se observar o esquema de um modelo de absorção de ácidos graxos, síntese de DAG e exportação para lipoforina.

Em vertebrados, o transporte de lipídios também ocorre através de uma lipoproteína, porém, esta se apresenta empacotada aos lipídios da dieta durante o transporte. Já em insetos, os lipídios, através da membrana dos enterócitos, são acoplados diretamente à Lp circulante na hemolinfa, realizando então o transporte pela hemolinfa (CHINO, 1985; SOULAGES; WELLS, 1994; CANAVOSO; WELLS, 2000). Destaca-se que a Lp transporta, prioritariamente, o DAG, levando-o até o órgão de destino, como o corpo gorduroso, onde ocorre a entrega do lipídeo para seu armazenamento (ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM, 2012).

Figura 3 - Esquema do processo de digestão, absorção, síntese de DAG e exportação para lipoforina. AG: Ácidos Graxos; ACS: Acil-CoA sintase; DAG: Diacilglicerol; TAG: Tricilglicerol; FATP: Proteína transportadora de ácidos graxos; Lp: Lipoforina; nLp: Lipoforina nascente; LTP: Partícula transferidora de lipídios.



Fonte: FREIRE, GONDIN, GRILLO; 2018.

Durante o processo de transporte de lipídios, também ocorre o inverso, a lipoforina se acopla a um lipídeo armazenado no corpo gorduroso e o conduz até o tecido de destino. A forma lipídica de estoque corresponde em 90% a triacilgliceróis, o principal lipídeo transportado é o diacilglicerol, podendo-se encontrar também colesterol, hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, carotenoides e fosfolipídios (CHINO; GILBERT, 1971; GONDIM; OLIVEIRA; MASUDA, 1989).

Outra diferença observada no transporte de lipídios entre vertebrados e insetos, consiste no fato de que a lipoforina, ao realizar sua função, não sofre processo de endocitose, ela volta à hemolinfa para se reabastecer e manter o transporte lipídico (TSUCHIDA; WELLS, 1990; SOULAGES; WELLS, 1994). Esta característica foi primeiramente constatada em larvas da libélula *Aeschna cyanea* (BAUERFEIND; KOMNICK, 1992).

O fluxo de lipídios da dieta para hemolinfa deve manter-se estável para manutenção da homeostase, visto que a concentração de TAG armazenada nos enterócitos serve de manutenção para constante formação de DAG e sua exportação para hemolinfa, evitando assim o acúmulo de DAG, que é tóxico em altas concentrações e assegurando a absorção máxima de ácidos graxos a partir do lúmen (CANAVOSO; WELLS, 2000).

Quanto aos carboidratos ingeridos, estes são convertidos em trealose nos enterócitos e, no processo de transporte pela hemolinfa, são transformados em glicose, que serão entregues ao corpo gorduroso por meio de transportadores específicos. No corpo gorduroso, os carboidratos são armazenados em forma de glicogênio, que podem ser mobilizados para utilização na hemolinfa em forma de trealose (LIU et al., 2009). Este processo de catabolismo e anabolismo dos carboidratos assemelha-se ao encontrado em outros insetos holometábolos, tais como *Apis mellifera* (SANTOS, 2017).

O corpo gorduroso apresenta características similares ao fígado e tecido adiposo dos vertebrados, ele é encontrado disperso por todo corpo dos artrópodes e é responsável pela síntese da maioria das proteínas hemolinfáticas (lipoforina) e atua como principal órgão de armazenamento de gordura, glicogênio e proteínas (LAW; WELLS, 1989).

Sabe-se que o corpo gorduroso é o principal órgão para o armazenamento de lipídios em insetos, e que os triacilgliceróis constituem a principal forma lipídica de estocagem. A concentração de TAG no corpo gorduroso é influenciada por alguns aspectos, tais como o estágio de desenvolvimento, estado nutricional, sexo e vôo migratório. O triacilglicerol é armazenado no citoplasma dos adipócitos do corpo gorduroso, em forma de gotículas lipídicas (ARRESE; PATEL; SOULAGES, 2006).

O processo de lipólise do triacilglicerol é regulado pela sinalização do hormônio neuropeptídeo adipocinético (AKH), que provoca uma ação semelhante ao glucagon mediado por um receptor acoplado à proteína G que ativa as respostas de sinalização de fosfato de inositol e cAMP. A mobilização de triacilglicerol é mediada por enzimas lipolíticas, tais como a TAG-lipase (ARRESE; PATEL; SOULAGES, 2006).

Em situações que requerem alto gasto energético, como a ovogênese e vôo, os triacilgliceróis armazenados são deslocados do corpo gorduroso por meio da TAG-lipase, liberando os diacilgliceróis, com o auxílio da LTP, para a lipoforina presente na hemolinfa, sendo então carregados até os tecidos em que há demanda, onde sofrem β -oxidação para aproveitamento imediato (ALVES-BEZERRA et al., 2015).

Além disto, o corpo gorduroso passa por uma remodelação para se adaptar fisiologicamente ao estado inicial da metamorfose. Este processo acontece entre a fase larval e adulta. Próximo à pupação, as células de gordura são consumidas ou destruídas perdendo sua forma poligonal, e após a formação de pupa, estas células são regeneradas tornando-se esféricas. Durante esta fase, as células são desassociadas e redistribuídas, mantidas como reserva energética até os 3 primeiros dias da fase adulta, quando então o inseto passa a ingerir e captar energia do alimento e novas células adiposas são regeneradas. Assim, a gordura inicialmente estocada no final da fase de larva serve como estoque nutricional para formação do adulto e sua manutenção nos primeiros dias (ZHENG et al., 2016).

Duas são as lipases de insetos envolvidas neste metabolismo: a lipase de triglicerídeo adiposo de inseto (ATGL) descrita em *Drosophila* (GRÖNKE et al., 2005), por exemplo, e a triacilglicerol lipase (TAG-Lipase) descrita inicialmente por Arrese e Wells (1994) em *Manduca sexta*, considerada como análoga à lipase hormônio sensível (HSL) do tecido adiposo de vertebrado. A TAG-lipase é a principal lipase caracterizada em insetos (HEIER; KÜHNLEIN, 2018), sendo uma enzima fosforilável, estimulada por hormônios adipocinéticos (AKHs) secretados pelas células neurosecretoras da córpora cardíaca na hemolinfa em condições de exigência energética que induz a mobilização de DAG no corpo gorduroso (ARRESE et al., 2001; LU et al., 2019). Os níveis de AKH regulam as concentrações de trealose e DAG na hemolinfa, sendo considerado funcionalmente como um análogo ao glucagon de mamíferos (ARRESE; SOULAGES, 2010; LU et al., 2019).

Nos insetos, as TAG-lipases já são reconhecidas em alguns hematófagos como *Rhodnius prolixus* (GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003), *Panstrongylus megistus* (CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004) e *Aedes aegypti* (GEERINC; FREYOGEL, 1975), em Lepidópteros como *Manduca sexta* (ARRESE; WELLS, 1994) e *Bombyx mori*

(PONNUVEL et al., 2003) e no besouro *Rhynchophorus palmarum* (SANTANA; BARBOSA; DINIZ, 2017). Os estudos sobre o processo de hidrólise da TAG- lipase em insetos sugerem forte semelhança com a ação da lipase pancreática de mamífero (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007).

O transporte de ácidos graxos em insetos apresenta várias lacunas ainda não elucidadas. Porém, merece destaque o papel da FATP/ACSVL, já descrito em *T. castaneum* (FREIRE; GONDIM; GRILLO, 2018), que exercem papel crucial no transporte de ácidos graxos extracelulares para as células. De forma semelhante, as proteínas de ligação a Acil-CoA (ACBP), também já tiveram seu papel descrito neste inseto, com ação no transporte e liberação de acil CoA de cadeia longa para a via da β oxidação e regulação da disponibilidade de lipídios para os vários processos metabólicos celulares (BATALHA; GONDIM; GRILLO, 2019).

Para além das funções de armazenamento energético (triacilglicerol e glicogênio) e de regulação hormonal, o corpo gorduroso também apresenta fundamental importância na manutenção do equilíbrio bioenergético mitocondrial. Por ser um órgão extenso e distribuído por todo o corpo do inseto, circundando o intestino e o aparelho reprodutor, o corpo gorduroso representa grande parte do peso total, principalmente na fase larval. É neste tecido onde se encontram a maioria das mitocôndrias que, de acordo com o estudo realizado em *Calpododes ethlius* (Lepidoptera: HesperIIDae), tem seu número, volume, área e divisão modificada em consonância com a fase de desenvolvimento do inseto. A maior parte das mitocôndrias larvais é destruída pouco antes da pupação por autólise, assim, o corpo gorduroso de pupas e adultos possuem poucas mitocôndrias (LARSEN, 1970; CHOWAŃSKI et al., 2017).

Ao analisar o metabolismo energético dos insetos, também devemos considerar que a regulação da alimentação envolve um complexo sistema de hormônios e numerosos fatores externos e internos. De forma análoga a dos mamíferos, o peptídeo semelhante à insulina (insulin like peptide - ILP), em insetos, é um hormônio que regula a alimentação de forma central, sendo responsivo a nutrientes, levando à diminuição do consumo de alimentos; e de forma periférica, atua nos tecidos para promover a captação de glicose e gordura. A sinalização do ILP também está envolvida na regulação do comportamento alimentar em insetos (LIN, YU, SMAGGHE; 2016).

O ILP e a via de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IIS) é evolutivamente conservada entre vertebrados e invertebrados nos níveis estrutural e funcional. A via do IIS é a principal via de sinalização que une o crescimento com o estado nutricional em todos os animais, influenciando assim o desenvolvimento animal, o metabolismo, a longevidade e a reprodução. O primeiro componente da via do IIS é o receptor de insulina (InR),

que é um receptor transmembrana que desencadeia a cascata de transdução do sinal IIS na ligação da insulina (SANG et al., 2016).

O estudo conduzido por Sang e colaboradores (2016) analisou os perfis de expressão de desenvolvimento de dois genes InR em *T. castaneum* e identificou que InR-1 é mais altamente expresso no estágio tardio do adulto deste inseto, seguido pelo estágio precoce da pupa, enquanto sua expressão foi mais baixa no estágio inicial da larva. Em contraste, o transcrito InR-2 foi mais expresso no estágio larval, particularmente no estágio larval tardio, seguido pelo estágio adulto tardio.

A alimentação de insetos é regulada por vários neuropeptídios, dentre eles, destacam-se as Sulfaquinina (SKs), que inibem a alimentação. Sulfaquininas são peptídeos que em insetos são homólogos ao sinal de saciedade de mamíferos regulada por gastrina e colecistocinina (CCK). Um estudo conduzido por Yu e colaboradores em 2013, identificou uma alta expressão de SK na cabeça de larvas e insetos adultos de *T. castaneum*. O referido estudo, o primeiro a utilizar este inseto como modelo experimental para estudo da SK, obteve, dentre outros resultados, o aumento drástico na ingestão de alimentos induzido pelo silenciamento de SK, apoiando o seu papel na regulação da ingestão alimentar (YU, NACHMAN, SMAGGHE; 2013).

Além da relação entre as vias de sinalização ILP/InR em *Tribolium castaneum*, comprovada por estudo conduzido por Lin, Yu e Smagghe (2016), a mesma pesquisa, apoiada em resultados obtidos em *Drosophila* (SODERBERG; CARLSSON; NASSEL, 2012), sugerem que há uma relação cruzada entre a sinalização do ILP e a Sulfaquinina na regulação da ingestão de alimentos, tendo em vista que ambos são co-expressos em células produtoras de insulina no cérebro de *Drosophilas*.

Diante da compreensão da forma pela qual vários mecanismos regulatórios se comunicam para regular o metabolismo em *T. castaneum*, este se apresenta como um modelo ideal para estudo de distúrbios, tais como a Síndrome Metabólica. Tal afirmação baseia-se no fato de que manifestações clínicas desta síndrome podem ser induzidas e analisadas neste inseto, tais como a obesidade, hiperglicemia e hipertrigliceridemia (VIDIGAL et al., 2013).

3.2 Síndrome Metabólica

Causas, efeito e prevalência da Síndrome Metabólica

Tendo em vista o sucesso no controle de várias doenças transmissíveis em todo o mundo, os interesses da comunidade científica mundial têm se voltado ao controle das Doenças

Crônicas Não Transmissíveis (DNTs), considerando sua alta taxa de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento. No contexto das DNTs, destaca-se a Síndrome Metabólica (SM), apontada como importante fator de risco para o desenvolvimento da obesidade, Diabetes Mellitus tipo 2, acidente vascular cerebral, doenças coronarianas, aterosclerose, dentre outras (SAKLAYEN, 2018).

O atual debate acerca da SM gira em torno da sua correlação com as doenças cardiovasculares (DCV), visto que ela se caracteriza como um complexo de distúrbios metabólicos, associado ao alto risco para o desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e de DCV, evidenciado por hiperglicemia, hipertensão, níveis elevados de triglicérides, valores diminuídos de colesterol de alta densidade (HDL-c) e obesidade abdominal (VIDIGAL et al., 2013).

A prevalência do sobrepeso e obesidade, numa perspectiva global em 2015, foi de 1,9 bilhões e 609 milhões de adultos, respectivamente, o que representa uma média de 39 % de toda população. Desde 1980, a prevalência da obesidade tem aumentado drasticamente quando comparada a 2015, apresentando um crescimento de 12,9 % para 64,2 % entre americanos, de 14,5 % para 22,9 % entre europeus e de 6,2 % para 12,7 % em africanos. Além disto, a obesidade é mais prevalente entre mulheres de todas as faixas etárias, com sobrepeso iniciado aos 20 anos, atingindo o máximo da obesidade entre 50 e 65 anos (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019).

A SM, inicialmente chamada de “Síndrome X”, além dos prejuízos individuais à saúde, acarreta elevados custos econômicos e sociais, visto que a estimativa do gasto total deste distúrbio, incluindo os cuidados de saúde e a perda de potencial para atividade econômica, chega a milhões de dólares. Além disto, em uma pessoa com SM o risco de morte aumenta duas vezes, e a chance para desenvolvimento de DM2 é cinco vezes maior (VIDIGAL et al, 2013). Como a SM é aproximadamente três vezes mais comum que o diabetes, sua prevalência global é estimada em cerca de um quarto da população mundial, ou seja, mais de um bilhão de pessoas no mundo são afetadas por esta síndrome (SAKLAYEN, 2018).

Diante da gravidade das estatísticas apresentadas, é de extrema importância que o conhecimento científico acerca da patogênese da SM avance. Pois, a compreensão de como vias metabólicas paralelas se correlacionam e resultam na instalação desta síndrome, proporciona o embasamento necessário para o desenvolvimento de alternativas preventivas, diagnósticas e de tratamento.

Partindo do princípio de que a SM está intimamente e principalmente relacionada à obesidade e ao DM2, a compreensão da sua patogênese também perpassa por estes pontos.

Vários são os fatores que interferem no metabolismo, seja de forma positiva ou negativa, gerando um estresse metabólico que culmina na SM.

No que se refere aos efeitos protetores, podemos citar o tecido adiposo marrom, que é recrutado para queimar gorduras e produzir calor quando há exposição a temperaturas baixas (YONESHIRO et al, 2013), os macrófagos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios estimulados pelo uso de Metformina, que apresentou resultados positivos na melhora da inflamação de baixo grau da obesidade (JING et al, 2017) e a administração de *Akkermansia muciniphila* viva ou pasteurizada que, em camundongos, impediu o desenvolvimento da obesidade e complicações associadas (PLOVIER et al, 2017). Em contrapartida, o estresse do retículo endoplasmático melhora a ativação dos macrófagos do tecido adiposo, diretamente relacionados à inflamação metabólica, contribuindo para a obesidade e dificultando a atividade do tecido adiposo marrom (SHAN et al, 2017).

Alterações no metabolismo dos lipídios em humanos, tais como aumento do triglicerídeo, aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL) são conhecidos fatores de risco para SM. Sobre estas condições, além de considerar a influência da hereditariedade (em torno de 48 %) e do ambiente, as variantes genéticas têm explicado aproximadamente 10 % da variabilidade dos fenótipos lipídicos (SAYOLS-BAIXERAS et al., 2016).

Apesar de estudos como o de Locke e colaboradores (2015) comprovarem a associação entre determinados genes, como o *Fat mass and obesity associated* (FTO), à obesidade e SM, pesquisas apontam para uma relação mais íntima entre estes distúrbios e a flexibilidade metabólica, ou seja, a (in)adaptação eficiente do metabolismo de acordo com oferta e demanda de nutrientes (OLSON; SCHELL; RUTTER, 2016). Isto explica o crescimento acentuado da obesidade e SM em países que passaram recentemente por mudanças no estilo de vida, com intensa urbanização, aumento do consumo de *fast foods* e do sedentarismo.

Desde 1983, Saltin e Gollnic já utilizavam o termo “plasticidade metabólica” ou “adaptabilidade” para se referirem às adaptações metabólicas do músculo esquelético ao exercício. Apenas em 1999, Kelley e colaboradores passaram a utilizar o termo “flexibilidade metabólica” ao identificar que o músculo esquelético de indivíduos magros e obesos escolhiam diferentes “combustíveis”, que poderiam resultar em distúrbios metabólicos e respostas orgânicas inadequadas (inflexibilidade metabólica) ou em adaptação, chamados de metabolicamente flexíveis (KELLEY et al., 1999; BATTAGLIA et al., 2012).

Inicialmente, a definição de flexibilidade metabólica estava intimamente relacionada à capacidade das mitocôndrias de selecionar combustível em resposta às alterações nutricionais,

passando, progressivamente, a se referir a organelas, órgãos e sistemas. Nos dias atuais, entende-se que essa expressão se relaciona às vias metabólicas que regulam a detecção, absorção, transporte, armazenamento e utilização de nutrientes por meio da síntese, degradação ou regulação da atividade de proteínas ou enzimas (SMITH et al., 2018).

Nesse sentido, a obesidade, componente de destaque da SM, pode ser caracterizada como uma incapacidade de equilibrar os processos intrínsecos à fome (lipolíticos) e à alimentação (antilipolíticos), ou seja, uma inflexibilidade metabólica. De forma semelhante, também é esta inflexibilidade que determina os mecanismos da resistência à insulina (AUCOUTURIER; DUCHÉ; TIMMONS, 2011), outro distúrbio presente na SM.

Observa-se, portanto, que a SM é altamente complexa e possui vias regulatórias que ainda não foram completamente elucidadas. Porém, pode-se afirmar sobre sua associação ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial, considerando que esta organela apresenta fundamental importância na transformação de intermediários do metabolismo, como piruvato, ácidos graxos e aminoácidos, nos equivalentes energéticos reduzidos NADH/FAD por meio da β oxidação e do ciclo de Krebs (FURUKAWA et al., 2004; MITCHELL; DARLEY-USMAR, 2012), assim sendo, desvios na função mitocondrial normal, causados por excesso ou falta de substratos, causam distúrbios sistêmicos, como a Síndrome Metabólica.

3.3 Bioenergética mitocondrial

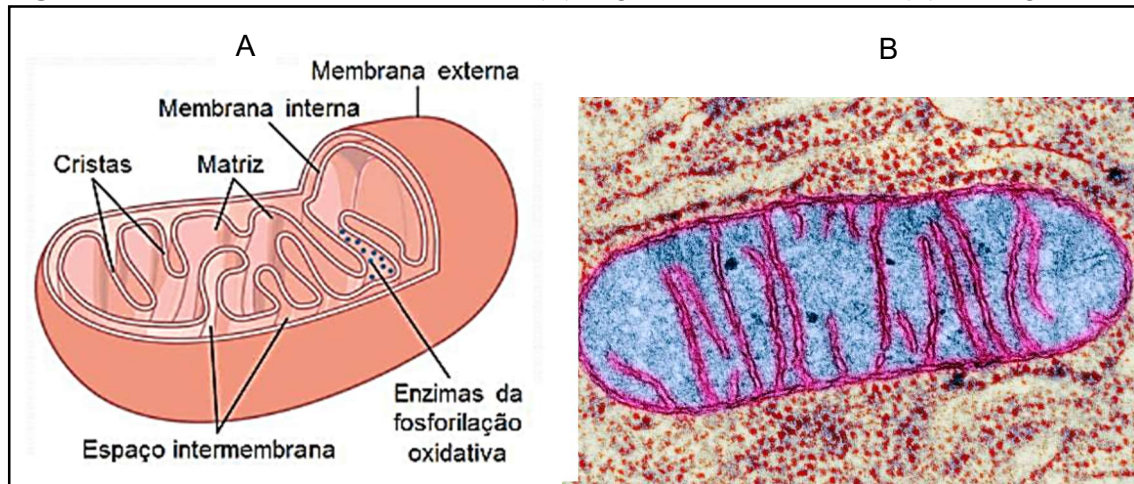
As mitocôndrias

Em humanos, as mitocôndrias desempenham diversas funções interligadas, como a produção de calor e de trifosfato de adenosina (ATP) para as atividades do organismo, além da produção e contribuição genética a partir do DNA mitocondrial. Estas organelas também produzem vários intermediários biossintéticos, contribuindo assim na resposta ao estresse celular, como autofagia e apoptose (MARIN-GARCIA; AKHMEDOV, 2016). As mitocôndrias formam uma rede dinâmica e interconectada que funciona de forma integrada a outros compartimentos celulares. As funções mitocondriais vão além do limite celular de um organismo, influenciando sua fisiologia e regulando a comunicação entre células e tecidos (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012).

O interstício delimitado pela membrana interna (Figura 4) é chamado de matriz mitocondrial, onde estão concentradas grandes quantidades das enzimas responsáveis pelo metabolismo energético (piruvato desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, enzimas da β -oxidação e da oxidação dos aminoácidos), inclusive o complexo enzimático chamado ATP

sintase, responsável por produzir ATP. É na matriz onde estão localizadas todas as vias de oxidação dos nutrientes, exceto a glicólise (NELSON; COX, 2014; ALBERTS et al., 2010).

Figura 4 – Mitocôndria e sua estrutura: (A) organização estrutural e (B) micrografia de MET.



Fonte: HALL, 2011.

Além da produção de energia celular por meio da produção de ATP, a importância das mitocôndrias também se destaca pela manutenção do metabolismo, caracterizado como um sistema complexo e regulado de maneira intrincada, por reações químicas que produzem e utilizam energia. O metabolismo é constituído por dois processos contrastantes, catabolismo e anabolismo. Catabolismo envolve reações de degradação de nutrientes em produtos menores (ácido láctico e CO_2), que geralmente são exergônicas, liberando energia que pode ser conservada na forma de uma ligação de fosfato presente no ATP. No anabolismo, precursores simples são transformados em moléculas maiores e complexas, como lipídeos, polissacarídeos e proteínas (NELSON; COX, 2014).

Na oxidação de carboidratos, lipídios e alguns aminoácidos há formação de acetil-CoA, que é o material de partida para o ciclo do ácido cítrico. Os esqueletos carbônicos de outros aminoácidos podem ser convertidos a outros intermediários do ciclo. Assim que o acetil-CoA entra no ciclo, sofre ação da primeira enzima, a citrato-sintase, que promove a sua condensação com o oxaloacetato para formação de citrato. O ciclo do ácido cítrico, em sete etapas, converte citrato a oxaloacetato promovendo a liberação de energia na forma de três moléculas de NADH, uma molécula de FADH_2 e um ATP. Por se tratar de uma via cíclica, os intermediários estão sendo consumidos e produzidos novamente (NELSON; COX, 2014).

Ao sofrerem catabolismo, as biomoléculas oxidadas liberam elétrons que podem ser captados pelas coenzimas nucleotídeos de nicotinamida (NAD^+ ou NADP^+) e nucleotídeos de

flavina (FMN ou FAD). Essas coenzimas também são conhecidas como aceptores universais de elétrons, pois fornecem os elétrons necessários para o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons. As formas reduzidas NADH e NADPH são carreadoras de elétrons que se associam a uma classe de enzimas desidrogenases ligadas a nucleotídeos de nicotinamida. Essas enzimas catalisam reações reversíveis de oxirredução desses compostos (CAMPBELL, 2013).

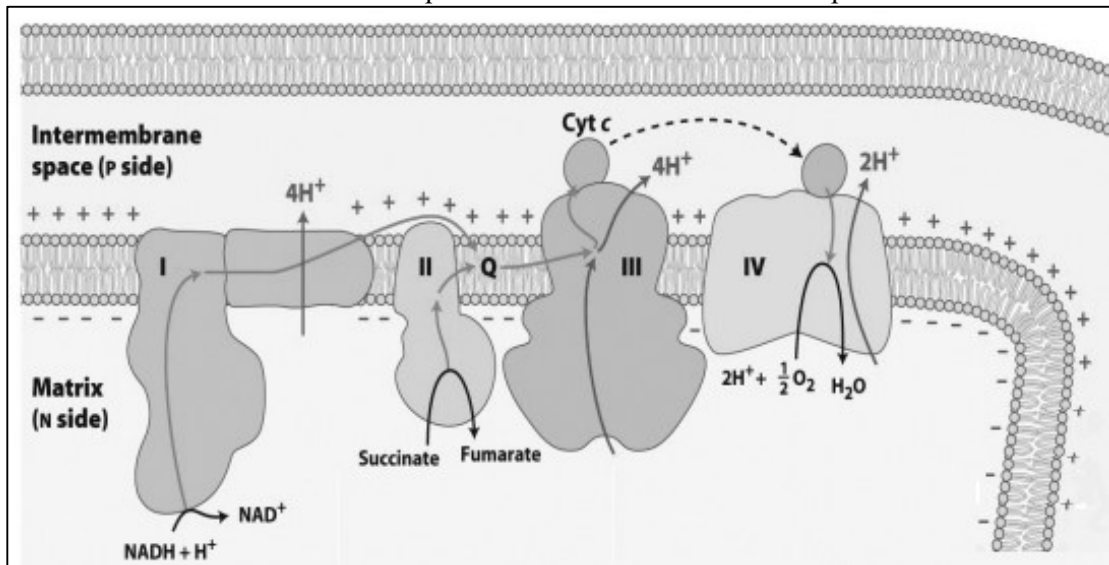
Nas reações de anabolismo, o NADH usualmente é direcionado para suprir os elétrons necessários, sendo conduzido à cadeia transportadora de elétrons onde sofre ação do primeiro complexo enzimático: NADH-desidrogenase mitocondrial ou complexo I. A membrana interna é impermeável a NADH, dessa forma, os elétrons conservados nas moléculas de NADH citosólicas são transferidos para seu equivalente redutor mitocondrial através de um sistema de lançadeiras. Os nucleotídeos de flavina (FAD e FMN) possuem um potencial de redução maior que os nucleotídeos de nicotinamida, além de serem capazes de aceitar dois ou apenas um elétron, neste último caso produzindo a forma semiquinona (CAMPBELL, 2013).

A ubiquinona (Q) e duas classes de proteínas que contém ferro (citocromos e proteínas ferro-enxofre) são outros três tipos de moléculas carreadoras de elétrons que estão organizadas em complexos supramoleculares na membrana interna mitocondrial e compõem a cadeia transportadora de elétrons. A ubiquinona é um carreador hidrofóbico capaz de se difundir livremente na bicamada lipídica e pode aceitar um (*QH) ou dois elétrons (QH₂), assim como os nucleotídeos de flavina (NELSON; COX, 2014).

Os citocromos são proteínas que possuem o grupo heme coordenado ao ferro. As mitocôndrias apresentam os tipos de citocromos a, b e c. Os citocromos das classes a, b e alguns da classe c são proteínas integrais de membrana. Contudo o citocromo c mitocondrial é uma proteína solúvel situada no espaço intermembrana. As proteínas ferro-enxofre, por outro lado, são compostas por centros de ferro coordenados a átomos de enxofres presentes em resíduos de cisteína e participam da transferência de um elétron, onde o átomo de ferro é reduzido ou oxidado (NELSON; COX, 2014).

Os citocromos e as proteínas ferro-enxofre estão organizadas em quatro complexos enzimáticos conforme demonstrado na Figura 5:

Figura 5 – O fluxo de elétrons e os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons



Fonte: NELSON; COX, 2014.

- **Complexo I** – também conhecido como NADH-desidrogenase, é um complexo enzimático grande que possui seis centros ferro-enzofre e uma flavoproteína (FMN). Este complexo enzimático é capaz de transferir o elétron presente no NADH para a ubiquinona, usando a energia proveniente desta transferência para bombear 4 prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana.

- **Complexo II** – também conhecido como succinato-desidrogenase (SDH), é uma enzima que faz parte do ciclo do ácido cítrico e catalisa a transferência de elétrons do succinato (oxidado a fumarato) para o FADH₂ e, posteriormente, para ubiquinona.

- **Complexo III** – também chamado de complexo do citocromo bc1, é capaz de acoplar a transferência de elétrons do ubiquinol (forma reduzida da ubiquinona) para o citocromo c, promovendo o transporte de mais quatro prótons da matriz para o espaço intermembrana.

- **Complexo IV** – ou citocromo oxidase, é o último complexo enzimático carreador de elétrons da cadeia transportadora de elétrons. Sua principal função é a transferência dos elétrons presentes no citocromo c para o oxigênio, reduzindo-o a água. Através da atividade do complexo IV, dois prótons são bombeados.

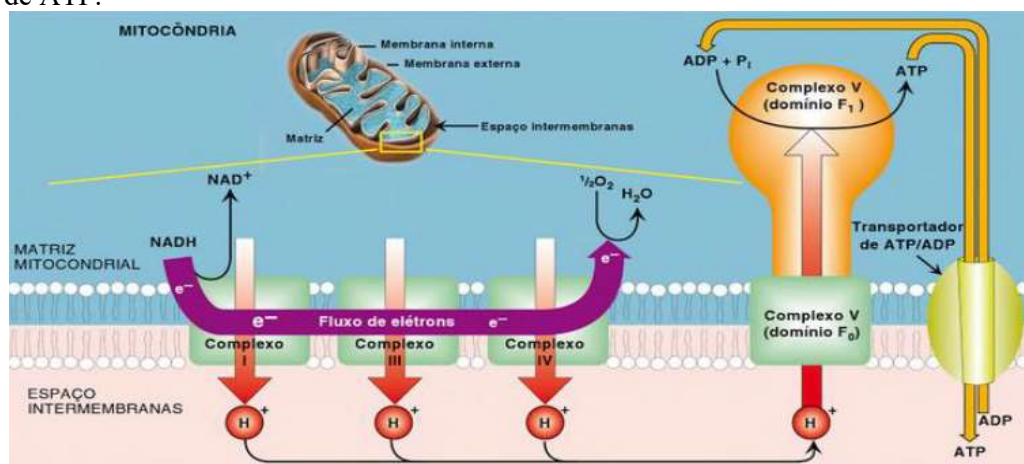
O gradiente de concentração de prótons é formado pelo contínuo bombeamento de prótons pelos multicomplexos enzimáticos da cadeia respiratória, sendo o espaço intermembranar com maior concentração dessa espécie. Segundo o modelo quimiosmótico, proposto por Peter Mitchell (1961), o potencial eletroquímico gerado pela diferença de concentração de prótons produz uma força próton-motriz capaz de promover a síntese de ATP (MURRAY et al. 2014).

A dependência da transferência de elétrons (oxidação) e a síntese de ATP (fosforilação) é explicada pela teoria quimiosmótica, afirmando que a força próton-motriz, gerada pelo gradiente de próton, impulsiona os prótons de volta à matriz através de um outro complexo enzimático, a ATP-sintase (JUNGE; NELSON, 2015) (Figura 6). A ATP-sintase é composta por dois elementos: F_0 , uma proteína integral de membrana que possui um poro para prótons, por onde os prótons bombeados na cadeia respiratória tornam a matriz; e F_1 , uma proteína periférica que possui sítios ativos de fosforilação do ADP (NELSON; COX, 2014).

A catálise rotacional é o fenômeno que explica o mecanismo de produção de ATP pela ATP-sintase. O subcomplexo F_0 é formado por um cilindro de subunidades protéicas c (c_{10}), ligado a uma subunidade γ com a forma de uma haste inclinada. Esta haste se encaixa na parte central do subcomplexo F_1 , formado por três subunidades proteicas α e três β , estas últimas possuem os sítios ativos de fosforilação. A subunidade β do primeiro sítio (β -ADP) está associada ao ADP e ao P_i , uma outra subunidade β estabiliza o ATP (β -ATP) e a última subunidade assume a conformação β -vazio (CAMPBELL, 2013).

A passagem de próton através da porção F_0 da ATP-sintase promove uma mudança conformacional nos três sítios ativos de F_1 . A corrente de prótons através do F_0 faz com que a subunidade γ rotacione, provocando a compressão das subunidades β , que alternam suas conformações proporcionando a síntese de ATP (JUNGE; NELSON, 2015; MURRAY et al. 2006). Em cada ciclo rotacional há formação de três moléculas de ATP. Os prótons transportados para a matriz pela ATP-sintase são bombeados de volta para o espaço intermembranar em um ciclo contínuo, mantendo o acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa (MURRAY et al. 2014).

Figura 6 – Cadeia transportadora de elétrons acoplada ao transporte de prótons. Fluxo de elétrons acompanhado do bombeamento de prótons e estabelecimento do potencial eletroquímico acoplado à síntese de ATP.



Fonte: CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009.

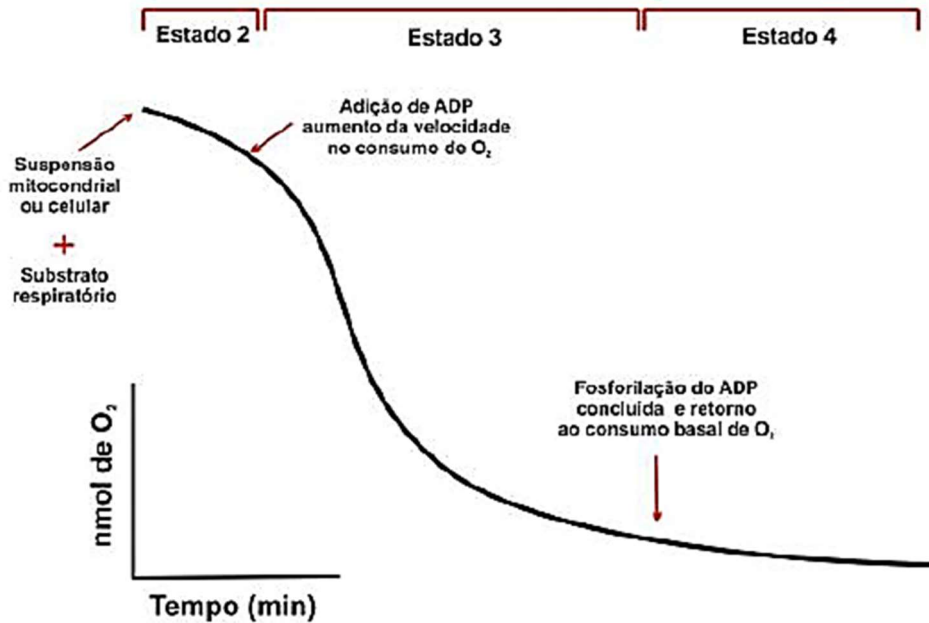
No que se refere a distúrbios metabólicos, tais como resistência à insulina e obesidade, já identificou-se relação destes com disfunção específica do complexo mitocondrial II (SDH). Em mitocôndrias de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, houve redução de 70% da atividade do complexo II/SDH (SVERDLOV et al., 2015). De forma semelhante, em indivíduos com obesidade grave, também constatou-se a redução da atividade deste complexo enzimático (NGO et al., 2019). Diante de tais resultados, este estudo propõe uma análise focalizada na atividade do complexo II/SDH.

Fosforilação oxidativa mitocondrial

Também conhecida como respiração mitocondrial, a fosforilação oxidativa mitocondrial teve sua cinética elucidada por Chance e Williams, em 1955. Num estudo com preparados de mitocôndrias, demonstrou-se que o consumo de oxigênio aumentava à medida que substratos e ADP eram adicionados ao homogenato (Figura 7) (MEISTER, 2009):

- **Estado 1** – caracterizado pela presença de mitocôndrias;
- **Estado 2** – adição do substrato para cadeia transportadora de elétrons (precursores de NADH, como os intermediários do ciclo do ácido cítrico ou succinato);
- **Estado 3** – ou estado fosforilativo ou velocidade de fosforilação (V3), caracterizado pelo início da fosforilação decorrente da adição de ADP, que é capaz de ativar a ATP-sintase, promovendo a entrada de prótons que, na matriz, atuam por *feedback* positivo intensificando a atividade da cadeia transportadora de elétrons e, assim, aumentando o consumo de oxigênio;
- **Estado 4** – ou estado de repouso ou velocidade de repouso (V4), caracterizado pelo esgotamento do ADP. Neste estado, o consumo de oxigênio diminui drasticamente atingindo um platô. O estado de repouso também pode ser induzido pela adição de inibidores específicos da ATP-sintase;
- **Estado 5** – caracterizado pela ausência de oxigênio.

Figura 7 – Cinética da respiração mitocondrial. Após adição do substrato (Estado 2) e adição de ADP, inicia-se a fosforilação (Estado 3) com aumento do consumo de oxigênio e sua consequente redução na matriz mitocondrial até que toda ADP tenha sido fosforilada, normalizando o consumo de oxigênio numa situação de repouso (Estado 4).



Fonte: MAIOLI, 2012.

Para compreensão de como ocorre a cinética da fosforilação oxidativa mitocondrial, vários inibidores e desacopladores foram amplamente utilizados tanto para a determinação da sequência de carreadores de elétrons da cadeia respiratória, quanto no esclarecimento do mecanismo de acoplamento existente entre a oxidação (cadeia transportadora de elétrons) e a fosforilação (ATP-sintase). Ainda hoje, essas substâncias são utilizadas para determinação do mecanismo de ação de muitas drogas que atuam em algum desses dois processos (MAIOLI, 2012).

A exemplo, a rotenona (inseticida) e o amobarbital (barbitúrico) inibem a NADH-desidrogenase (Complexo I) bloqueando a transferência de elétrons entre o centro de ferro-enxofre e a ubiquinona. A antimicina-A e o dimercaprol são capazes de inibir o complexo III da cadeia respiratória entre os citocromos b e c. O ácido sulfídrico (H₂S), monóxido de carbono (CO) e o cianeto (CN⁻) inibem a citocromo oxidase (complexo IV). Por outro lado, a oligomicina é um antibiótico capaz de bloquear a ATP-sintase (MURRAY et al. 2014).

A função dos desacopladores é promover a dissociação entre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa. O 2,4-dinitrofenol e o CCCP (carbonil cianida m-clorofenilhidrazona) têm sido utilizados com maior frequência. Estes desacopladores são anfipáticos e aumentam a permeabilidade da membrana interna a prótons, reduzindo o potencial

eletroquímico e fazendo com que a oxidação ocorra independente da ATP-sintase (MURRAY et al. 2014).

O desacoplamento entre a cadeia respiratória e a síntese de ATP também ocorre em condições fisiológicas, devido a ação da proteína desacopladora UCP. A UCP é uma proteína da membrana mitocondrial interna, presente em grandes quantidades no tecido adiposo marrom de mamíferos, que atua como um canal de próton, utilizando a energia proveniente da força próton-motriz para a produção de calor (MAIOLI, 2012).

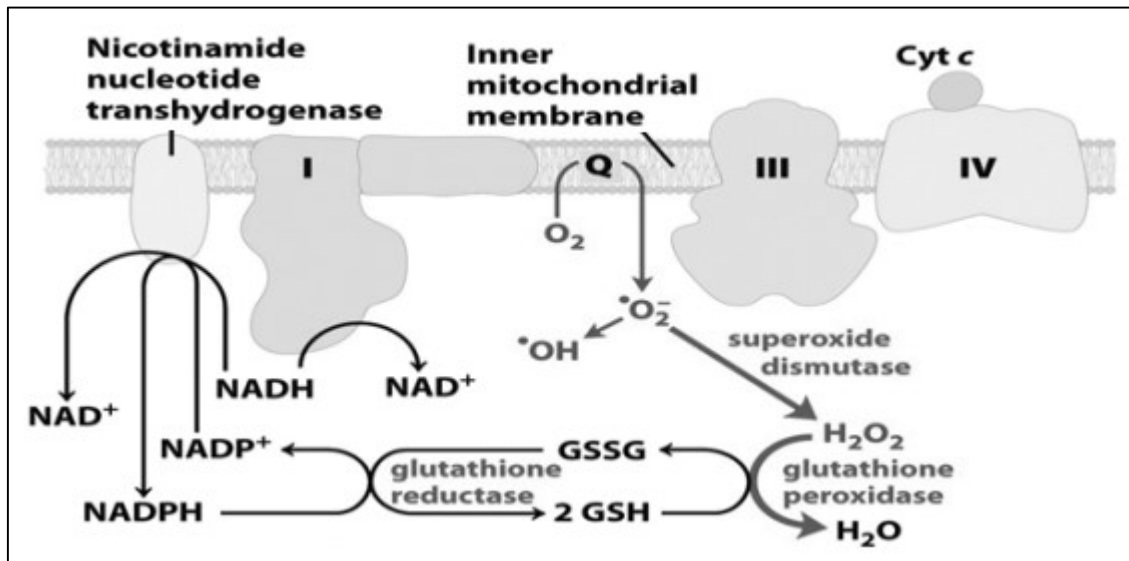
Espécies Reativas de Oxigênio

As reações de oxirredução da cadeia transportadora de elétrons resulta na redução do O_2 , formando H_2O . O oxigênio molecular apresenta elétrons desemparelhados no estado fundamental, por isso tende a receber um elétron por vez. Dessa forma a redução incompleta do oxigênio molecular pode gerar radicais livres reativos que causam danos na célula (KOWALTOWSKI et al., 2009).

A transferência dos elétrons do ubiquinol para o Complexo III, assim como a passagem de elétrons do complexo II para a ubiquinona (Q), envolve a formação do intermediário *Q que, em uma condição extraordinária, pode doar um elétron ao O_2 , promovendo a formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A parcela de oxigênio que é reduzida a superóxido na respiração mitocondrial tem sido estimada entre 0,1 a 1% do total de oxigênio consumido. Este achado reforça a necessidade de um sistema antioxidante (sistema redox) suficiente para proteger os organismos aeróbios do dano ocasionado pelos radicais livre (NELSON; COX, 2014).

A formação do radical livre superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode conduzir à produção de radical hidroxila (OH^{\cdot}), ainda mais reativo, via reação de Fenton. Com a finalidade de impedir os danos oxidativos (estresse oxidativo), causados por estes radicais, a mitocôndria possui um sistema antioxidante eficiente capaz de inativá-los, composto pela superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, glutathiona, NAD(P) transhidrogenase, NADH, vitaminas E e C, e a própria respiração. (KOWALTOWSKI et al., 2009). A enzima superóxido dismutase presente na matriz mitocondrial, por exemplo, catalisa a conversão do $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Uma segunda enzima (glutathiona-peroxidase) converte H_2O_2 em H_2O , como demonstrado na Figura 8, que a depender da concentração, é inofensivo para a célula (NELSON; COX, 2014).

Figura 8 - Produção e eliminação de radicais livres na mitocôndria. Formação de radical livre superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) e parte do sistema enzimático antioxidante (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione redutase).

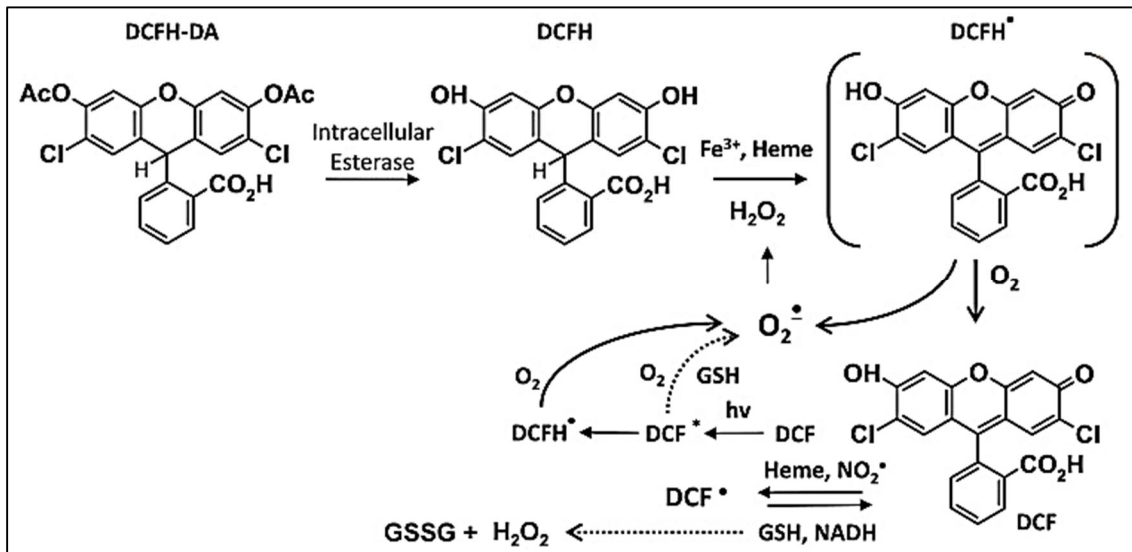


Fonte: GODOY; ALVES, 2009.

A vida útil das EROs (superóxido: $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrogênio: H_2O_2 e peroxinitrito: $ONOO^{\cdot}$) em sistemas biológicos varia de nanossegundos a segundos, dependendo da reatividade e da capacidade do sistema antioxidantes celular. A detecção destas espécies reativas requer sondas que reagem muito rapidamente, pois competem com antioxidantes na captação das EROs e produção de produtos estáveis e quantificáveis (DIKALOV; HARRISON, 2014).

Dentre os vários métodos disponíveis para quantificação das ERO, destaca-se aqui a sonda de Fluorescência de diclorodi-hidrofluoresceína (DCF), considerando que foi a utilizada neste estudo. O Diclorodi diacetato ($H_2DCF-DA$) é um éster lipofílico e não fluorescente que, após passar pela membrana plasmática é desesterificado para um álcool hidrofílico [H (2) DCF (di-hidroclorofluoresceína)] que pode ser oxidado em DCF fluorescente (2', 7'-diclorofluoresceína) por um processo que envolve espécies reativas de oxigênio, como demonstrado na Figura 9. Os resultados obtidos com a utilização desta sonda possibilitam quantificar espécies reativas gerais, mas, principalmente o H_2O_2 , isto se deve ao fato de que o DCFH não reage diretamente com H_2O_2 , além de que várias espécies oxidantes de um elétron podem oxidar o DCFH₂ em DCF (HEMPEL et al., 1999; DIKALOV; HARRISON, 2014).

Figura 9 - Reações intracelulares do diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA) e ciclagem redox da 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCF).



Fonte: DIKALOV; HARRISON, 2014.

Disfunções mitocondriais e consequente aumento da geração de EROs estão fortemente relacionadas às alterações presentes na Síndrome Metabólica, tais como resistência à insulina e Diabetes, hiperglicemia, distúrbios do metabolismo dos lipídios e obesidade. Isto se deve ao fato de que a alta ingestão calórica e baixo gasto energético podem causar aumento do gradiente de prótons e menor demanda de ATP, assim, o excesso de elétrons são transferidos para o O₂ sem a consequente produção de ATP (GREEN; LORENZO; GUIDO, 2011).

O excesso de ERO ocasionado por danos oxidativos aos lipídios (peroxidação) e oxidação de proteínas da cadeia respiratória, que afetam o metabolismo e a importação de proteínas que induzem danos ao DNA, podem exacerbar ainda mais a disfunção mitocondrial (GREEN; LORENZO; GUIDO, 2011), estimulando assim os distúrbios secundários, como a Síndrome Metabólica.

A oxidação descontrolada de lipídios mediada por EROs é conhecida como peroxidação lipídica, um importante processo biológico que resulta em espécies lipídicas oxidadas e atuam como mediadores lipídicos bioativos. Como são mais polares do que os lipídios precursores, os peróxidos lipídicos (LPOs) podem perturbar as bicamadas da membrana, afetando sua estrutura e interferindo nas funções intracelulares, diminuindo a fluidez, inativando as proteínas ligadas à membrana e, finalmente, levando à destruição da membrana (WONG-EKKABUT et al., 2007).

Nesse contexto, já comprovou-se a associação entre peroxidação lipídica, EROs e Síndrome Metabólica através de estudos utilizando modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, onde observou-se que os distúrbios oriundos da inflexibilidade metabólica

se devem ao estresse oxidativo no tecido adiposo perivascular ocasionado pelo aumento da produção de O_2^- e H_2O_2 , agravando os riscos cardiovasculares (KETONEN et al., 2010). De forma semelhante, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, constatou-se o agravamento da disfunção endotelial no tecido adiposo perivascular ocasionado pelo aumento na produção de O_2^- (GIL-ORTEGA et al., 2009).

De forma específica, a disfunção mitocondrial em células adiposas de obesos relaciona-se à redução da atividade do ciclo do ácido cítrico, da β oxidação e de enzimas da cadeia transportadora de elétrons (FROMENTY et al., 2004). Além de tais mecanismos, níveis reduzidos de colesterol-HDL e altas concentrações de colesterol em macrófagos também já foram associados à disfunção mitocondrial na aterosclerose (ALLEN; GRAHAM, 2012).

Para além do conhecimento já consolidado acerca da relação existente entre Síndrome Metabólica e metabolismo bioenergético, a proposição da utilização do *T. castaneum* como modelo para estes estudos é algo inovador, marcado pela emergente necessidade de mudança de modelos vertebrados e poucos trabalhos realizados, como demonstra a pesquisa na base de dados PubMed em junho de 2020, com os descritores “*Tribolium castaneum* AND mitochondria”, com um total de 9 artigos disponíveis publicados entre 2010 e 2020, porém, nenhum se debruça sobre a função mitocondrial em distúrbios metabólicos neste inseto, evidenciando assim uma lacuna científica e um área promissora a ser investigada.

Desta forma, ao entender a Síndrome Metabólica como uma inflexibilidade do metabolismo em consequência da disfunção mitocondrial, pesquisas também têm avaliado o efeito terapêutico de determinados fármacos, como a insulina, que foi capaz de aumentar a atividade do complexo II/SDH em mitocôndrias de adipócitos da gordura subcutânea de obesos graves (NGO et al., 2019). De igual forma, além de analisar as respostas metabólicas e bioenergéticas de *T. castaneum* em condição análoga à SM, também será analisado os efeitos de fármacos amplamente utilizados no tratamento da hipertrigliceridemia, condição encontrada nesta síndrome. Neste sentido, utilizou-se um estimulante da lipólise integrante da classe dos Fibratos, o Fenofibrato.

3.4 Fenofibrato: um estimulante da lipólise

Os fibratos são derivados do ácido fíbrico, medicamentos de escolha no tratamento da hipertrigliceridemia com importante papel no controle das dislipidemias mistas. Devido sua capacidade de reduzir os triacilgliceróis, os fibratos se apresentam como uma das primeiras opções para o tratamento dos pacientes com hipertrigliceridemia, incluindo aqueles com

diabéticos tipo 2 e dislipidemia (XAVIER, 2005). Ensaios clínicos mostraram que as terapias com fibratos são capazes de reduzir os triglicerídeos plasmáticos em 20 – 50% (FLAVELL et al., 2000).

Este grupo farmacológico (fenofibrato, gemfibrozil, bezafibrato, ciprofibrato e clofibrato) atua, em parte, alterando a transcrição de genes envolvidos no metabolismo das lipoproteínas, através da estimulação dos receptores nucleares ativados de proliferação dos peroxissomas, os conhecidos PPAR, além de regularem enzimas associadas à β -oxidação (GUEDES, 2012). Devido a tais mecanismos, tem-se como resultados o aumento do catabolismo celular, diminuição do triglicerídeo hepático e redução do ganho de peso na obesidade induzida por dieta (MANCINI et al., 2001).

Receptores Nucleares (RN) são proteínas que regulam a transcrição de genes-alvo, intermediando os efeitos de hormônios nas células. São importantes fatores de transcrição envolvidos com o desenvolvimento embrionário, manutenção da diferenciação de fenótipos celulares, metabolismo e morte celular. Alterações na regulação dos RN podem levar ao desenvolvimento de distúrbios reprodutivos (infertilidade), proliferativos (câncer) e metabólicos (obesidade e diabetes mellitus) (GRONEMEYER; GUSTAFSSON; LAUDET, 2004).

Devido à tal importância, vários RN têm sido estudados como alvos farmacológicos e terapêuticos. Dentre eles, destaca-se o PPAR por sua associação com alterações metabólicas, tais como a obesidade, metabolismo lipídico, resistência à insulina e diabetes mellitus. O PPAR- α age principalmente como sensor de ácidos graxos e seus metabólicos intermediários, com função central na regulação do catabolismo e da síntese de lipídios (YU; REDDY, 2007).

Estes RN apresentam três isoformas com diferentes funções e distribuições. Em específico, o PPAR- α apresenta genes-alvo relacionados ao metabolismo lipídico, como a oxidação, transcrição de fatores inflamatórios, ligação e transporte de ácidos graxos pelas membranas e transporte de lipoproteínas. É principalmente expresso no fígado, mas também no rim, coração, tecido adiposo, endotélio e músculo esquelético. Possui os ácidos graxos livres como ligantes endógenos e os fibratos como ligante exógeno (YU; REDDY, 2007).

Em vertebrados, fibratos atuam por estímulo ao PPAR- α , levando ao aumento da produção e da ação da lipase lipoprotéica (LPL) e redução da apoproteína CIII (Apo CIII), mecanismos estes, que estimulam a lipólise dos triacilgliceróis, do VLDL e dos quilomícrons. Atuam também diminuindo a síntese das VLDL, pois reduzem a produção dos triglicerídeos devido ao estímulo da β oxidação dos ácidos graxos no fígado (GUEDES, 2012).

Além de interferir em condições associadas à Síndrome Metabólica, como a hipertrigliceridemia, obesidade e resistência à insulina, fibratos também já tiveram funções relacionadas ao metabolismo mitocondrial. Exemplo disto é o ciprofibrato, que além de reduzir a hipertrigliceridemia em ratos transgênicos, também normalizou a respiração mitocondrial e preveniu a transição de permeabilidade mitocondrial (ALBERICI et al., 2003). De forma semelhante, identificou-se que terapia com fenofibrato foi capaz de aumentar o nível de mRNA de genes da proteína desacopladora mitocondrial (UCP) em ratos (NAKATANI et al., 2002). Também já comprovou-se a interferência do fenofibrato em mitocôndrias isoladas de ratos, por meio de uma diminuição súbita e severa da respiração destas organelas, em específico, inibindo a atividade do complexo I (ZUNGU; FELIX; ESSOP, 2006).

Em busca realizada no Banco de Dados de Genes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), constata-se a inexistência do receptor nuclear PPAR no genoma de *T. castaneum*. Mas, estudos experimentais iniciais comprovaram a efetividade do fenofibrato em reduzir os níveis de triacilglicerol do corpo gorduroso de larvas deste inseto. Apoia-se a esta afirmativa o fato de que o fenofibrato também possa atuar de maneira independente do PPAR α (WILK et al., 2015). Desta forma, infere-se que, no modelo em estudo, o mecanismo de ação farmacológico esteja associado principalmente ao metabolismo mitocondrial, sendo portanto, um importante ponto a ser investigado.

Assim, diante da necessidade de se avançar em pesquisas que contribuam tanto na compreensão da inter-relação entre as complexas vias intrincadas na gênese da SM, quanto em métodos terapêuticos relacionados principalmente à disfunção mitocondrial, propõe-se a utilização de modelos experimentais alternativos, como o *T. castaneum*.

A utilização deste modelo para estudo da Síndrome Metabólica oferece possibilidades ainda não desbravadas. Exemplo disto é o regulador pós-transcricional de diversos processos fisiológicos e patológicos, o miR-33, amplamente associado à regulação do metabolismo do colesterol, oxidação dos ácidos graxos e sinalização de insulina, sendo alvos de pesquisas funcionais e buscas terapêuticas.

3.5 miR-33 e metabolismo lipídico

Os microRNAs são RNAs não-codificantes, pequenos (< 200 nucleotídeos, como os miRs) ou longos (\geq 200 nucleotídeos, como os lncRNAs), que podem regular de forma indireta a expressão gênica pós-transcricional por se ligarem aos RNAs mensageiros (RNAm) de genes-alvos correspondentes e os degradarem ou inibirem sua tradução (BUSHATI; COHEN, 2007;

JEFFRIES; SAWALHA, 2015), bem como por meio de interações com processos epigenéticos (PESCHANSKY; WAHLESTEDT, 2014).

Apesar do reconhecido papel regulador dos miRs, sua importância no meio científico é uma descoberta recente, há poucos anos estas moléculas ainda eram vistas como lixo citoplasmático, resultados da degradação de transcritos moleculares (LIN; MILLER; YING, 2006). Hoje, no entanto, já se sabe que, apesar de pequenos, possuem a capacidade de orquestrar inúmeros processos celulares responsáveis pela manutenção da vida e gênese de doenças. Neste sentido, o miR-33 é o miR mais descrito em estudos do metabolismo lipídico (NORATA et al, 2013) e tem suas sequências altamente conservadas em insetos, sendo portanto modelos de baixo custo e alta reprodutibilidade, considerando a estreita relação de homologia entre as espécies.

O aumento da expressão do miR-33 já foi associado à diminuição da biogênese hepática do colesterol HDL em camundongos (RAYNER et al., 2010). De forma semelhante, também em camundongos, a inibição da sua expressão promoveu redução das placas ateroscleróticas, alterando o transporte lipídico e a inflamação (RAYNER et al., 2011/a). Resultados semelhantes foram encontrados em primatas não humanos (RAYNER et al., 2011/b), demonstrando assim que tais achados são promissores do ponto de vista terapêutico e farmacológico.

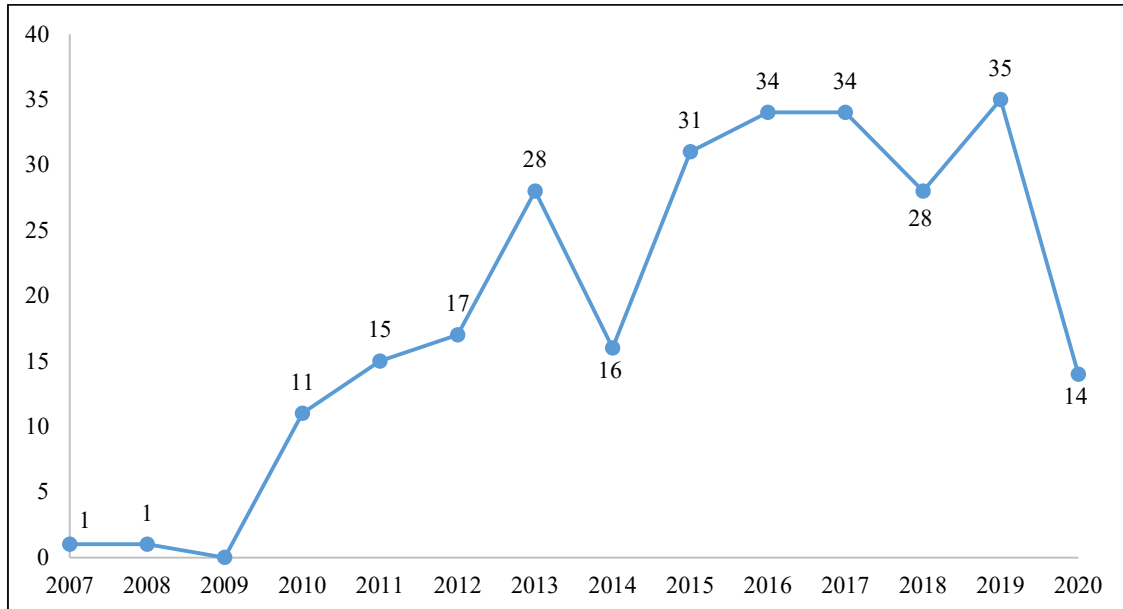
O miR-33 é uma família de microRNAs precursores, expressos em várias espécies, sendo em humanos, formado por dois componentes, miR-33a e miR-33b, ambos localizados em regiões intrônicas dos genes *Srebp-2* e *Srebp-1*, que estão diretamente relacionados ao metabolismo de lipídios (MARQUART et al, 2010; NAJAFI-SHOUSHTARI et al, 2010; RAYNER et al, 2010).

O trabalho desenvolvido por Davalos e colaboradores (2011), infere sobre a ação conjunta entre o miR-33a e b e seus genes hospedeiros *Srebp-2* e *Srebp-1*, sobre o metabolismo lipídico de *Drosophila*, sugerindo que a co-transcrição de *SREBP-2* e miR-33a ou *SREBP-1* e miR-33b regulam tanto o metabolismo do colesterol como a oxidação dos ácidos graxos e a sinalização de insulina, três dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da SM.

A isoforma miR-33a apresenta-se bastante conservada entre diversos organismos, desde invertebrado, como *T. castaneum*, até vertebrados humanos. Já o miR-33b não é conservado em roedores (DÁVALOS et al, 2011). Tais constatações são bastante relevantes no processo de escolha do modelo experimental a ser utilizado durante o processo de estudo com estes RNAs. Um levantamento na base de dados *Web of Science* demonstra o crescente número de

publicações utilizando o descritor miR-33, com um total de 265 produções registradas até junho de 2020 (Figura 10).

Figura 10 - Evolução anual do número de artigos publicados na base de dados *Web of Science* com busca pela palavra chave “miR-33”, realizada em junho de 2020.

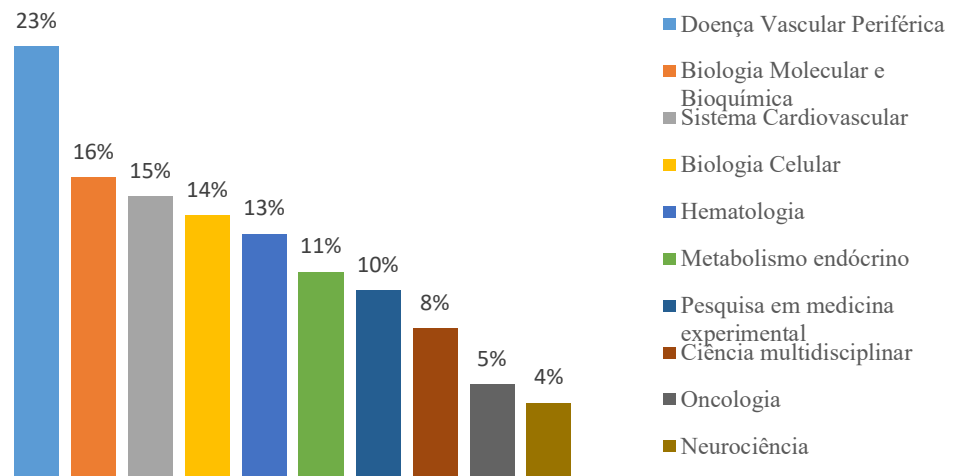


Fonte: Autores, 2020.

Não são poucos os esforços na busca por novas abordagens terapêuticas no tratamento de doenças cardiometabólicas, tais como a aterosclerose e SM. No contexto da investigação do miR-33, estas condições não tem sido diferente, podendo ser comprovado pelo crescente número de artigos abordando Doença Vascular Periférica (23 %), seguida de Biologia Molecular e Bioquímica (16 %) e Sistema Cardiovascular (15 %). Além do mais, este miR também tem sido objeto de estudo no campo da oncologia e neurociências (Figura 11). As diversas áreas de estudo refletem o mecanismo de ação pleiotrópico dos miRs, (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006; BRENNECKE et al, 2005).

No quesito artigos originais disponíveis sobre o miR-33 na mesma base de dados, 67 % das pesquisas se referem à sua associação ao metabolismo de lipídios (Dados disponíveis no capítulo V). Esta informação enfatiza a possibilidade da sua utilização em um produto biotecnológico que auxilie no diagnóstico precoce, tratamento e/ou estadiamento destes distúrbios metabólicos. Os 33 % das pesquisas restantes estão distribuídas entre as diversas áreas apresentadas na Figura 11.

Figura 11 – Principais áreas de pesquisa dos artigos indexados na base *Web of Science* com busca pela palavra chave “miR-33”, realizada em junho de 2020.

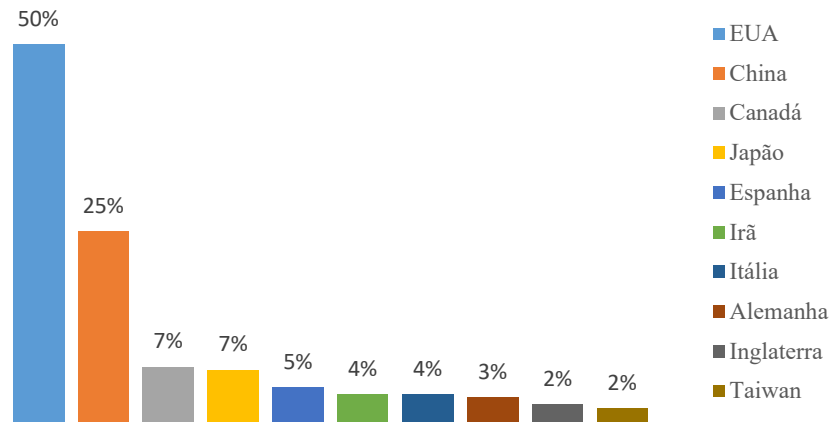


Fonte: Autores, 2020.

Dentre os países produtores deste conhecimento (Figura 12), destacam-se os Estados Unidos da América (EUA), sendo responsáveis por mais da metade da produção científica depositada na base de dados *Web of Science*, com um total de 133 (50,2 %) artigos publicados. Neste *ranking*, o Brasil aparece em 14º lugar, com dois artigos publicados (0,7 %), estando ainda à frente de países como Áustria e Bélgica, ambos com apenas uma produção científica cada (0,3 %).

O estudo prospectivo na base de dados *Derwent Innovations Index*, em junho de 2020, utilizando o descritor “miR-33”, identificou 34 pedidos de depósitos de patentes. Destes, destaca-se o produto biotecnológico reivindicado pelo número WO2012027704-A1 (2012), com o título *Treating a metabolic syndrome comprises administering a microRNA-33 inhibitor to the subject* (Acesso no *Derwent*: 2012-C76717), que se refere a uma formulação farmacêutica contendo o inibidor de miR-33, úteis no tratamento da SM em um indivíduo. Diante disto, as perspectivas para novos estudos podem se concentrar no desenvolvimento de produtos biotecnológicos que auxiliem no diagnóstico precoce e estadiamento da SM.

Figura 12 - Principais países a publicarem artigos indexados na base de dados *Web of Science* com busca pela palavra chave “miR-33”, realizada em junho de 2020.



Fonte: Autores, 2020.

O grande interesse dos EUA pelo miR-33 no metabolismo lipídico (Figura 12), reflete em produção tecnológica, visto que o pedido de depósito de patente referido foi reivindicado por professores pesquisadores dos EUA, vinculados à Universidade Estadual de Nova Iorque.

A partir deste enfoque, um desafio atual que perpassa por aspectos éticos e econômicos, é a substituição de modelos vertebrados em pesquisas científicas para ensaios de expressão e manipulação de genes. Neste sentido, várias pesquisas vêm utilizando insetos como modelo aos quais os resultados foram posteriormente validados em mamíferos (ROTH; PORTER, 1964; TELFER, 1960 e 1961; DEMIR; DICKSON, 2005; SAKAI; KITAMOTO, 2006).

É a partir desta perspectiva que este estudo apresenta o *Tribolium castaneum* como modelo alternativo para estudos do metabolismo lipídico através do miR-33, englobando aspectos relacionados aos colesterol e distúrbios como a resistência à insulina, fatores associados à Síndrome Metabólica.

Referências

AKAM, M.; HOX, H. Homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell*. n. 57, p. 347-349, 1989.

ALBERICI, L. C.; et al. Hypertriglyceridemia increases mitochondrial resting respiration and susceptibility to permeability transition. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. v. 35, n. 5, p. 451-457, 2003.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.

ALLEN, A. M.; GRAHAM, A. G. Mitochondrial function is involved in regulation of cholesterol efflux to apolipoprotein (apo) AI from murine RAW 264.7 macrophages. **Lipids in health and disease**. n. 11, v. 1, p. 169, 2012.

ALVES-BEZERRA, M.; et al. Adipokinetic Hormone Receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 69, p. 51-60, 2016.

ARRESE, E. L.; et al. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochem Mol Biol**. v. 31, p. 7–17, 2001.

ARRESE, E. L.; PATEL, R. T.; SOULAGES, J. L. The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A(1): identification and characterization. **J Lipid Res**. n. 47, v. 12, p. 2656-67, 2006.

ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect Fat Body : Energy, Metabolism, and Regulation. **Annu Rev Entomol**. n. 55, p. 207–228, 2010.

ATELLA, G. C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Metabolismo de Lipídeos. *In: TÓPICOS Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular*. Rj: INCT, 2012. p. 170–191.

AUCOUTURIER J.; DUCHÉ P.; TIMMONS B. W. Metabolic flexibility and obesity in children and youth. **Obes Rev**. n. 12, v. 5, p. 44–53, 2011.

BALDWIN, R.; FASULO, T. Confused Flour Beetle, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae) and Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). **IFAS Extension**, University of Florida, p. 1–6, 2003.

BATALHA, M. M. C; GONDIM, K. C.; GRILO, L. A. M. **Estudo da expressão gênica de proteínas ligadoras de acil-coenzima A no inseto *Tribolium castaneum***. 2019. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – UFAL, 2019.

BATTAGLIA G. M.; ZHENG D.; HICKNER, R. C.; HOUMARD, J.A. Effect of exercise training on metabolic flexibility in response to a high-fat diet in obese individuals. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 303, n. 12, p. 1440–45, 2012.

BAUERFEIND, R.; KOMNICK, H. Lipid-loading and unloading of lipophorin in the midgut epithelium of dragonfly larvae, *Aeshna cyanea*. **Journal of Insect Physiology**. v. 38, p. 147–160, 1992.

BEENAKKERS, A. M. T.; VAN DER HORST, D. J.; VAN MARREWIJK, W. J. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. **Progress in Lipid Research**. v. 24, n. 1, p. 19-67, 1985.

- BEHMER, S. T.; ELIAS, D. O.; GREBENOK, R. J. Phytosterol metabolism and absorption in the generalist grasshopper, *Schistocerca americana* (Orthoptera: criidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 42, p. 13–25, 1999.
- BENTON, M. A.; PAVLOPOULOS, A. Tribolium embryo morphogenesis: May the force be with you. **Bioarchitecture**. v. 4, n. 1, p. 16–21, 2014.
- BINGSOHN, L.; KNORR, E.; VILCINSKAS, A. The model beetle *Tribolium castaneum* can be used as an early warning system for transgenerational epigenetic side effects caused by pharmaceuticals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v. 185, n. 186, p. 57-64, 2016.
- BOMAN, H. G.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 41, p. 103-126, 1987.
- BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol.** v. 3, p. 85, 2005.
- BUSHATI, N.; COHEN, S. M. MicroRNA functions. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 23, p. 175-205, 2007.
- CAMPBELL, M. K.; **Bioquímica**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- CANAVOSO, E. Ã.; FREDE, S.; RUBIOLO, E. R. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera : Reduviidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 845–854, 2004.
- CANAVOSO, L. E.; WELLS, M. A. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 1173–1180, 2000.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- CHINO, H. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. *In*: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Eds.). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, v.10, p. 115–135, 1985.
- CHINO, H.; DOWNER, R. G. H.; et al. Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect hemolymph. **Insect Biochemistry**. v. 11, n. 4, p. 491, 1981.
- CHINO, H.; GILBERT, L. I. The uptake and transport of cholesterol by haemolymph lipoproteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 1, p. 337-347, 1971.
- CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism**. v. 92, p. 6-10, 2019.
- CHOWANSKI, S.; et al. Insect peptides—perspectives in human diseases treatment. **Current medicinal chemistry**. v. 24, n. 29, p. 3116-3152, 2017.

CISNE, J. L. Trilobites and the Origen of Arthropods. **Science**. n. 186, p. 13-18. 1974.

DÁVALOS, A. et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. **PNAS**. v.108, 2011.

DEMIR, E.; DICKSON, B. J. Fruitless splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. **Cell**. v.121, p.785–794, 2005.

DEVI, M. B.; DEVI, N. V. Biology of Rust-Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Biological Forum – An International Journal**. n. 7, v. 1, p. 12-15, 2015.

DIKALOV, S. I.; HARISSON, D. G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. **Antioxidants & redox signaling**. n. 20, v. 2, p. 372-382, 2014.

DOURLEN, P.; SUJKOWSKI, A.; WESSELLS, R.; MOLLEREAU, B. Fatty acid transport proteins in disease: new insights from invertebrate models. **Progress in Lipid Research**. v. 60, p. 30-40, 2015.

FARONI, L. R.; FRABETTI, D. R. **Principais pragas de grãos armazenados**. Net, Minas Gerais, out. 2009. Disponível em: <http://www.centreinar.org.br>. Acesso em: 10 jun. 2018.

FISHER, R. A. On the Evidence Against the Chemical Induction of Melanism in Lepidoptera. **Proceedings of the Royal Society of London**. v. 112, p. 407-416. 1933.

FLAVELL, D. M. et al. Variation in the PPAR α gene is associated with altered function in vitro and plasma lipid concentrations in Type II diabetic subjects. **Diabetologia**. v. 43, n. 5, p. 673-80, 2000.

FRASER, M. J. Insect Transgenesis : Current Applications and Future Prospects. **Annual Review of Entomology**. v. 57, p. 267–91, 2012.

FREIRE, C. C. S. D.; GONDIM, K. C.; GRILLO, L. A. M. **Metabolismo de Lipídeos em Inseto Coleóptero: Digestão e Transporte de Ácidos Graxos**. 2018. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Maceió, 2018.

FROMENTY, B. et al. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. **Diabetes & metabolismo**. v. 30, n. 2, p. 121-138, 2004.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest**. v. 114, n. 12, p. 1752–61. doi:10.1172/JCI21625, 2004.

GIL-ORTEGA, M.; SOMOZA, B.; ARANGUEZ, I.; RUIZ-GAYO, M.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M. S. Changes in resistance artery function during the development of diet-induced obesity. **Hypertension**. v. 54, p. 105–106, 2009.

GEERINC, K.; FREYOGEL, T. A. Lipase activity and stimulation mechanism esterases in the midgut of female of *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol**. v. 21, 1975.

- GODOY, F. A.; ALVES, S. C. C. Cross-talk of Mitochondrial Signaling Pathways: implications in muscle atrophy. **Saúde Rev.**, Piracicaba, v. 11, n. 28/29, p. 57-70, maio-dez. 2009.
- GONDIM, K. C.; OLIVEIRA, P. L.; MASUDA, H. Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: Transfer of phospholipids. **Journal of Insect Physiology**. v. 35, n.1, p.19-27, 1989.
- GREEN, D. R.; LORENZO, G.; GUIDO, K. Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. **Science**. v. 333, n. 6046, p. 1109-1112, 2011.
- GREVENGOED, T. J.; KLETT, E. L.; COLEMAN, R. A. Acyl-CoA metabolism and partitioning. **Annual Review of Nutrition**. v. 34, p. 1-30, 2014.
- GRILLO, L. A. M. **Metabolismo de lipídios no intestino do inseto *Rhodnius prolixus***. Tese (Doutorado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 37, n. 6, p. 579-588, 2007.
- GRILLO, L. A. M.; PONTES, E. G.; GONDIM, K. C. Lipophorin interaction with the midgut of *Rhodnius prolixus*: characterization and changes in binding capacity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, n. 4, p. 429–438, 2003.
- GRONEMEYER, H.; GUSTAFSSON, J. A.; LAUDET, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. **Nat Rev Drug Discov**. v. 3, n. 11, p. 950-64. DOI: 10.1038/nrd1551, 2004.
- GRÖNKE, S. et al. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. **Cell Metab**. v. 1, n. 5, p. 323-30. doi: 10.1016/j.cmet.2005.04.003, 2005.
- GRÜNWARD, S.; STELLZIG, J.; ADAM, I. V. et al. Longevity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* is enhanced by broccoli and depends on nrf-2, jnk-1 and foxo-1 homologous genes. **Genes & Nutrition**. v. 8, p. 438-448, 2013.
- GUEDES, V. P. O. **Farmacologia clínica dos antilipídicos**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina). Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2012. 60 p.
- HALL, J. E.; GUYTON & HALL: **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2011.
- HAYAKAWA, Y.; KATO, D.; KAMIYA, K.; MINAKUCHI C.; MIURA, K. Chitin synthase 1 gene is crucial to antifungal host defense of the model beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of invertebrate pathology**. v. 143, p. 26-34, 2017.
- HEIER, C.; KÜHNLEIN, R. P. Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**. v. 210, p. 1163–1184, 2018.

HEMPEL, S. L.; BUETTNER, G. R.; O'MALLEY, Y. Q.; WESSELS, D. A.; FLAHERTY, D. M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med.** v. 27, p. 146–159, 1999.

HOY, M. A. **Insect Molecular Genetics: an introduction to principles and applications.** Ed. California: Genes, genome organization, and development in insects. 1994.

INSUA, J. L.; LLOBET, E.; MORANTA, D.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, C.; TOMÁS, A.; GARMENDIA, J.; BENGOCHEA, J. A. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. **Infect Immun.** v. 81, n. 10, p. 3552-65. DOI: 10.1128/IAI.00391-13. 2013.

JEFFRIES, M. A.; SAWALHA, A. H. Autoimmune disease in the epigenetic era: how has epigenetics changed our understanding of disease and how can we expect the field to evolve?. **Expert review of clinical immunology.** v.11, p.45-58, 2015.

JING, Y.; WU, F.; LI, D.; et al. Metformin improves obesity associated inflammation by altering macrophage polarization. **Mol cell Endocrinol.** v. 461, PMID 28935544, 2017.

JUNGE, W.; NELSON, N. ATP synthase. **Annual Review of Biochemistry.** v. 84, p. 631-657, 2015.

KEILIN, D. **The History of Cell Respiration and Cytochrome.** Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1966.

KELLEY, D. E.; GOODPASTER, B.; WING, R. R.; SIMONEAU, J. A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **Am J Physiol.** v. 277, n. 6, p. 1130–114, 1999.

KETONEN, J.; TARU, P.; EERO, M. Caloric restriction reverses high-fat diet-induced endothelial dysfunction and vascular superoxide production in C57Bl/6 mice. **Heart and vessels.** v. 25, n. 3, p. 254-262, 2010.

KOWALTOWSKI, A. J.; DE SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine.** v. 47, p. 333-343, 2009.

LARSEN, W. J. Genesis of mitochondria in insect fat body. **J Cell Biol.** v. 47, n. 2, p. 373–383, 1970.

LAW, J. H.; WELLS, M. A. Insects as biochemical models. **J. Biol. Chem.** v. 267, p. 16335-16338, 1989.

LIN, S. L.; MILLER, J. D.; YING, S. Y. Intronic MicroRNA (miRNA). **J Biomed Biotechnol.** p. 1–13. doi: 10.1155/jbb/2006/26818, 2006.

LIN, X.; YU, N.; SMAGGHE, G. Insulin receptor regulates food intake through sulfakinin signaling in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Peptides.** v.80, p. 89-95, 2016.

- LIU, Y.; et al. Hormonal and nutritional regulation of insect fat body development and function. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**: Published in Collaboration with the Entomological Society of America. v. 71, n. 1, p. 16-30, 2009.
- LOCKE, A. E.; KAHALI B, B. S.; et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**. v. 518, n. 7538, p. 197–206. doi: 10.1038/nature14177, 2015.
- LU, K.; et al. Adipokinetic Hormone Receptor Mediates Trehalose Homeostasis to Promote Vitellogenin Uptake by Oocytes in *Nilaparvata lugens*. **Front Physiol**. v. 9, p. 1–12, 2019.
- MAIOLI, M. **Papel da mitocôndria na citotoxicidade induzida pela abamectina em hepatócitos isolados de rato**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Estadual Paulista (UNESP). Araçatuba, 2012.
- MAJEROWICZ, D.; et al. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* : Lessons from the genome. **Gene**. v. 596, p. 27–44, 2017.
- MANCINI, F. P.; et al. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. **FEBS letters**. v. 491, n. 1-2, p. 154-158, 2001.
- MARANHÃO, Z. G. **Entomologia Geral**. 2.ed. São Paulo: Nobel, 1977.
- MARÍN-GARCÍA, J.; AKHMEDOV, A. T. Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure. **Heart Fail Rev**. v. 21, n. 2, p. 123-136. doi:10.1007/s10741-016-9530-2, 2016.
- MARQUART, T. J.; ALLEN, R. M.; ORY, D. S.; BALDÁN, A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.107, p.12228–12232, 2010.
- MEISTER, A. **Advances in enzymology - and related areas of molecular biology**. **John Wiley & Sons**, ISSN: 1934-4694, 2009.
- MITCHELL, T.; DARLEY-USMAR, V. Metabolic syndrome and mitochondrial dysfunction: insights from preclinical studies with a mitochondrially targeted antioxidant. **Free Radic Biol Med**. v. 52, n. 5, p. 838–840. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.014, 2012.
- MORGAN, D. O. **The Cell Cycle: Principles of Control**. [s.l.] New Science Press Ltd, 2007.
- MURRAY, R. K.; et al. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 29 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- MUTTKOWSKI, R.A. Studies on the blood of insects. I. The composition of the blood. **Bull. Brooklyn Entomol. Soc**. v. 18, p. 127-136, 1923.
- NAJAFI-SHOUSHTARI, S. H.; et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. **Science**. v.328, p.1566–1569, 2010.

- NAKATANI, T.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; MIURA, S.; EZAKI, O. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor- α activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 11, p. 9562-9569, 2002.
- NELSON, D.L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1274 p.
- NGO, D. T. M.; SVERDLOV, A. L.; KARKI, S.; et al. Oxidative modifications of mitochondrial complex II are associated with insulin resistance of visceral fat in obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 316, n. 2, p. 168–77. doi: 10.1152/ajpendo.00227, 2018.
- NORATA, G. D.; SALA, F.; CATAPANO, A. L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. MicroRNAs and lipoproteins: a connection beyond atherosclerosis? **Atherosclerosis**. v. 227, p. 209-215, 2013.
- NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**. v. 148, n. 6, p. 1145-1159, 2012.
- OLSON, K. A.; SCHELL, J. C.; RUTTER J. Pyruvate and metabolic flexibility: illuminating a path toward selective cancer therapies. **Trends Biochem Sci**. v. 41, n. 3, p. 219–230, 2016.
- ORIEL, C.; LASKO, P. Recent Developments in Using *Drosophila* as a Model for Human Genetic Disease. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 19, n. 7, p. 2041. DOI: 10.3390/ijms19072041, 2018.
- PESCHANSKY, V. J.; WAHLESTEDT, C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. **Epigenetics**. v.9, p.122003-122014, 2014.
- PLOVIER, H.; EVERARD, A.; DRUART, C.; et al. A purified membrane protein from *A. muciniphila* or pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. **Nat Med**. v. 23, n. 1, p. 107–113. doi: 10.1038/nm.4236, 2017.
- PONNUVEL, K. M.; et al. A Lipase Isolated from the Silkworm *Bombyx mori* Shows Antiviral Activity against Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**. v. 77, n. 19, p. 10725–10729, 2003.
- RAYNER, K. J.; et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. **J Clin Invest**. v.121, p.2921-31 a, 2011.
- RAYNER, K. J.; et al. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. **Nature**. v.478, p. 404–407 b, 2011.
- RAYNER, K. J. et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. **Science**. v.328, p. 1570–1573, 2010.
- RICARTE FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and câncer. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v.50, 2006.

RICHARDS, S.; et al. *Tribolium* genome sequencing consortium. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**. v. 452, p. 949–955, 2008.

ROTH, T. F.; PORTER, R. R. Yolk uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Cell. Biol.** v. 20, p. 313 – 332, 1964.

SAKAI, T.; KITAMOTO, T. Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. **Journal of Neurobiology**. v. 66, p. 821–834, 2006.

SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Curr Hypertens Rep.** v. 20, 2018.

SANG, M.; LI, C.; WU, W.; LI, B. Identification and evolution of two insulin receptor genes involved in *Tribolium castaneum* development and reproduction. **Gene**. v. 585, n. 2, p. 196–204, 2016.

SANTANA, C. C.; BARBOSA, L. A.; DINIZ, I. Lipase Activity in the Larval Midgut of *Rhynchophorus palmarum*: Biochemical Characterization and the Effects of Reducing Agents. **Insects**, 2017.

SANTOS, D. E. **O metabolismo oxidativo na diferenciação de castas em abelhas melíferas: número e estrutura mitocondrial e expressão de genes indicadores de funcionalidade.** 2017. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

SAYOLS-BAIXERAS, S.; IRVIN, M. R.; ELOSUA, R.; ARNETT, D. K.; ASLIBEKYAN, S. W. Epigenetics of lipid phenotypes. **Current cardiovascular risk reports**. v. 10, n. 10, p. 31, 2016.

SHELLER, K.; KARLSON, P. Effects of ecdysteroids on RNA synthesis of fat body cells in *Calliphora vicina*. **J. Insect Physiol.** v. 23, p. 285 – 291, 1977.

SCHMIDT-OTT, U.; LYNCH, J. A. Emerging developmental genetic model systems in holometabolous insects. **Curr Opin Genet Dev.** v.39, p. 116–128, 2016.

SHAN, B.; WANG X, W. Y.; et al. The metabolic ER stress sensor IRE1 α suppresses alternative activation of macrophages and impairs energy expenditure in obesity. **Nat Immunol.** May. v. 18, n. 5, p. 519-529, 2017.

SMITH, R. L.; SOETERS, M. R.; WÜST, R. C. I.; HOUTKOOPE, R. H. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. **Endocr Rev.** v. 39, n. 4, p. 489–517. doi:10.1210/er.2017-00211, 2018.

SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology.** New York: Ed. McGraw-Hill, 1993.

SÖDERBERG, J. A.; CARLSSON, M. A.; NÄSSEL, D. R. Insulin-Producing Cells in the *Drosophila* Brain also Express Satiety-Inducing Cholecystinin-Like Peptide, Drosulfakinin. **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 3, n. 109, 2012.

- SOULAGES, J. L.; WELLS, M. A. Lipophorin, the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. **Advances in Protein Chemistry**. v.45, p.371-415, 1994.
- SVERDLOV, A. L.; ELEZABY, A.; BEHRING, J. B.; et al. High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. **J Mol Cell Cardiol**. v. 78, p. 165–173. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.07.018, 2015.
- TELFER, W. H. The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. **J. Biophys. Biochem. Cytol**. v.9, p.747-754, 1961.
- TELFER, W. H. The selective accumulation of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. **Biol. Bull**. v.119, p.338-346, 1960.
- TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Isolation and characterization of a lipoprotein receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**. v.265, p. 5761–5767, 1990.
- TURUNEN, S.; CRAILSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. *In*: LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. (Eds.). **Biology of insect midgut**. Londres: Chapman & Hall, 1996. p.293-320.
- VIDIGAL, F. C.; BRESSAN, J.; BABIO, N.; SALAS-SALVADÓ, J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**. v.13, p.1198, 2013.
- VLEUGELS, R.; LENAERTS, C.; VANDEN BROECK, J.; VERLINDEN, H. Signalling properties and pharmacology of a 5-HT₇ -type serotonin receptor from *Tribolium castaneum*. **Insect Molecular Biology**. v.23, p.230-243, 2014.
- WILK, A.; WYCZECHOWSKA, D.; ZAPATA, A.; et al. Molecular mechanisms of fenofibrate-induced metabolic catastrophe and glioblastoma cell death. **Mol Cell Biol**. v. 35, n. 1, p. 182–198. doi:10.1128/MCB.00562-14, 2015.
- WONG-EKKABUT, J.; XU, Z.; TRIAMPO, W.; TANG, I. M.; TIELEMAN, D. P.; MONTICELLI, L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. **Biophys J**. v. 93, n. 12, p. 4225–4236. doi: 10.1529/biophysj.107.112565, 2007.
- XAVIER, H. T. Pharmacology of fibrates. **Arq. Bras. Cardiol**. v. 85, n 5, Out. 2005.
- YONESHIRO, T.; AITA, S.; MATSUSHITA, M.; et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. **J Clin Invest**. v. 123, n. 8, p. 3404–3408. doi:10.1172/JCI67803, 2013.
- YU, N.; NACHMAN, R. J.; SMAGGHE, G. Characterization of sulfakinin and sulfakinin receptor and their roles in food intake in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **General and Comparative Endocrinology**. v. 188, p. 196-203, 2013.

YU, S.; REDDY, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochim Biophys Acta**. v. 1771, n. 8, p. 936-51.
DOI:10.1016/j.bbaliip.2007.01.008, 2007.

ZHENG, H.; YANG, X.; XI, Y. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. **Life Sciences**. v. 167, p. 22–31, 2016.

ZHU, F.; et al. Integrated analysis of cytochrome P450 gene superfamily in the red flour beetle , *Tribolium castaneum*. **BMC Genomics**. v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

ZUNGU, M.; FELIX, R.; ESSOP, M. Wy-14,643 and fenofibrate inhibit mitochondrial respiration in isolated rat cardiac mitochondria. **Mitochondrion**, v. 6, n. 6, p. 315-322, 2006.

4 *Tribolium castaneum* como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídeos: uma prospecção tecnológica

***Tribolium castaneum* como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídeos: uma prospecção tecnológica**

Resumo

Realizou-se uma prospecção tecnológica objetivando analisar pedidos de depósitos de patentes referentes à utilização do *Tribolium castaneum* como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídios, por meio de patentes das bases de dados PatentEscope e Espacenet, e artigos científicos da PubMed. A maioria dos pedidos de depósitos se refere a repelentes de pestes/controla de pragas, o que é explicado pelo fato do *T. castaneum* ser uma das principais pragas de grãos armazenados com distribuição mundial. Desta forma, nenhum dos pedidos analisados se refere à sua utilização como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídios, assim como não encontrou-se artigo científico explicitando seu desenvolvimento. Diante desta lacuna, conclui-se que esta é uma área tecnológica pouco explorada e potencialmente útil para novas pesquisas e produtos.

Palavras-chave: *Tribolium castaneum*. Carboidratos. Lipídios.

4.1 Introdução

Os insetos constituem a forma de vida animal mais abundante no planeta, com espécies organizadas em aproximadamente 800 famílias e distribuídas em 32 ordens, sendo o grupo mais numeroso o dos artrópodes, que compreendem cerca de 70% de todas as espécies animais conhecidos (HOY, 1994; CHOWANSKI et al., 2017). Um dos fatores de sucesso de adaptação dos insetos se baseia no fato de apresentarem metamorfose completa, ou seja, fases de ovo, larva, pupa e adulto (CISNE, 1974). Outro ponto é a presença de asas, possibilitando a conquista

dos ambientes mais diversos, eficiência na busca do alimento, defesa contra predação, além de garantir o fluxo gênico das espécies através da migração (MARANHÃO, 1977; CHOWANSKI et al., 2017).

Várias pesquisas utilizaram insetos como modelos experimentais as quais foram posteriormente observadas em mamíferos. Dentre as quais pode-se destacar o processo de seleção natural observado em *Biston betularia* (FISHER, 1933); a identificação do processo de endocitose mediada por receptores (ROTH; PORTER, 1964; TELFER, 1960 e 1961); a compreensão do mecanismo de ação de hormônios esteroidais através de experimentos com ecdisona (SCHELLER; KARLSON, 1977); a descoberta do citocromo c (KEILIN, 1966) e das scropinas e peptídeos antibacterianos (BOMAN; HULTMARK, 1987); estudos com *Drosophila melanogaster*, onde através da biologia molecular identificou-se genes “*homeobox*” responsáveis por determinar o padrão de organização dos eixos corporais e sua homologia com vertebrados (AKAM, 1989) e estudos genéticos e moleculares que apontaram os locais do Sistema Nervoso Central relevantes para comportamentos sexuais masculinos (DEMIR; DICKSON, 2005; SAKAI; KITAMOTO, 2006).

Desta forma, vem sendo mais frequente a realização de estudos buscando a utilização de insetos como modelos experimentais alternativos, resultando em achados que possam ser reproduzíveis em vertebrados (INSUA et al., 2013). Assim, o *Tribolium castaneum*, importante praga de grãos armazenados, tem sido a segunda escolha como sistema modelo para estudos em insetos, ficando atrás apenas da mosca-da-fruta *D. melanogaster*, que lidera as pesquisas na área de genética (DÖNITZ et al., 2013).

O sucesso observado com a utilização do *T. castaneum* se deve à rápida reprodução, alta fecundidade, intervalos curtos de geração, baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis, genoma acessível em banco de dados, além das sequências de genes apresentarem intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos, compartilhando com estes cerca de 126 grupos de genes ortólogos (RICHARDS et al., 2008).

Devido à alta homologia observada entre o *T. castaneum* e humanos e o alto grau de conservação em sequências com domínios característicos de famílias de proteínas, muitos estudos têm sido realizados utilizando este inseto como modelo, como por exemplo estudos de interação entre fatores nutricionais e expressão gênica, utilizando genes homólogos. A facilidade na incorporação de fatores nutricionais em sua alimentação tem o colocado como importante modelo para estudos deste tipo, constituindo uma alternativa importante para a diminuição do uso de animais em laboratórios para testes de *screening* (GRÜNWALD et al., 2013).

Pesquisa sobre o metabolismo lipídico de *Rhodnius prolixus* (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM; 2007) elucidou pontos sobre o processo digestivo e metabolismo de lipídios em insetos, inferindo que tais mecanismo ocorrem de forma análoga à dos mamíferos. Tal informação, associada às características específicas do *T. castaneum*, colocam-no como modelo experimental ideal para estudos do metabolismo de lipídios e carboidratos. Desta forma, este trabalho tem como objetivo realizar uma revisão patentária e bibliográfica, por meio de uma prospecção tecnológica, que correlacione a utilização do *T. castaneum* como modelo experimental para estudos do metabolismo de lipídeos e carboidratos.

4.2 Metodologia

Trata-se de uma pesquisa exploratória nas bases de dados de patentes *World Intellectual Property Organization* (WIPO – PATENTSCOPE) e ESPACENET® (Banco Europeu de Patentes, LATIPAT), para delineamento do atual cenário tecnológico acerca da utilização do *T. castaneum* como modelo experimental para estudos em metabolismo de lipídeos e carboidratos, sendo esta a tecnologia a que se refere tal prospecção. A busca foi realizada durante o período de 25 de junho a 10 de julho de 2019 e todas as etapas da análise foram realizadas por dois pesquisadores de forma independente, de forma a aumentar a fidedignidade e sensibilidade dos dados coletados. A partir das palavras chave selecionadas, buscou-se por patentes e artigos científicos desde o primeiro registro até o ano 2018.

Na base de dados PatentScope padronizou-se a busca pela marcação da opção “organismos – PCT” e com a utilização do campo “página de cobertura” para pedidos de depósito via PCT, em todas as línguas. Na base Espacenet utilizou-se o campo “busca avançada”, buscando por palavras chave no título e resumo. Foi criado um banco de dados utilizando o *software* Excel® e para tabulação dos gráficos usou-se o *software* GraphPad Prism6®.

Para revisão bibliográfica, foi realizada busca de artigos na base de dados PubMed, comparando os artigos desta busca com os pedidos de depósito de patente via PCT na base PatentScope, visto sua maior abrangência. O operador booleano AND foi usado para indicar ao *software* combinação de termos. As palavras chave utilizadas nas bases de dados de patentes e artigos estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Palavras chave utilizadas nas buscas de patentes e artigos.

PATENTSCOPE, ESPACENET e PUBMED	ESPACENET
<i>Tribolium castaneum</i>	<i>Tribolium castaneum</i>
Experimental model	Modelo experimental
Hypertriglyceridemia	Hipertrigliceridemia
Dyslipidemia	Dislipidemia
Hyperglycemia	Hiperglicemia

Fonte: Autores, 2019.

4.3 Resultados e Discussão

Busca de patentes e artigos científicos nas bases por palavras chave

Os resultados para as buscas de patentes com pedido de depósito via PCT na base PatentScope e para as buscas de artigos científicos na base PubMed referentes ao termo *Tribolium castaneum* apresentaram resultados similares, demonstrando consenso entre o interesse na produção científica e tecnológica, como demonstrado na Tabela 3. O mesmo ocorre ao correlacionar as palavras chave “*Tribolium castaneum* AND experimental model”, onde observa-se similaridade entre o número de patentes e artigos, além de demonstrar mais especificidade sobre o objeto de interesse. Diante de tais resultados, optou-se por realizar a busca nas bases de dados PatentScope e PubMed através dos termos “*Tribolium castaneum* AND experimental model”, devido à maior especificidade.

Tabela 3 – Número de patentes e artigos obtidos a partir da busca com as palavras chave selecionadas.

Palavras chave	PATENTSCOPE	ESPACENET	PUBMED
<i>Tribolium castaneum</i>	1.155	05	1.379
Experimental model	140.419	00	1.849.948
Hypertriglyceridemia	5.119	02	14.486
Dyslipidemia	8.119	04	91.956
Hyperglycemia	13.280	01	63.892
<i>Tribolium castaneum</i> AND experimental model	188	00	111
<i>Tribolium castaneum</i> AND hypertriglyceridemia	00	00	00
<i>Tribolium castaneum</i> AND dyslipidemia	00	00	00

<i>Tribolium castaneum</i> AND hyperglycemia	00	00	00
Experimental model AND hypertriglyceridemia	1.881	00	1.179
Experimental model AND dislipidemia	3.173	00	7.667
Experimental model AND hyperglycemia	6.206	00	7.405

Fonte: Autores, 2019.

O resultado das buscas na base Espacenet com as palavras chave em português apresentou maior especificidade, como apresentado na Tabela 4. Porém, ainda é possível observar que há diminuição acentuada no número de patentes com as palavras chave *Tribolium castaneum*, quando comparada à base PatentScope, e ao relacionarmos as outras palavras chave, a busca é nula. Desta forma, a análise na base Espacenet ocorreu utilizando-se os termos *Tribolium castaneum* e Modelo experimental, separadamente, como forma de contemplar o objetivo deste estudo.

Tabela 4 – Número de patentes obtidas a partir da busca com as palavras chave selecionadas.

Palavras chave	ESPACENET
<u><i>Tribolium castaneum</i></u>	<u>05</u>
<u>Modelo experimental</u>	<u>66</u>
Hipertrigliceridemia	336
Dislipidemia	1.012
Hiperglicemia	428
<i>Tribolium castaneum</i> AND modelo experimental	00
<i>Tribolium castaneum</i> AND hipertrigliceridemia	00
<i>Tribolium castaneum</i> AND dislipidemia	00
<i>Tribolium castaneum</i> AND hiperglicemia	00
Modelo experimental AND hipertrigliceridemia	00
Modelo experimental AND dislipidemia	00
Modelo experimental AND hiperglicemia	00

Fonte: Autores, 2019.

De acordo com a *International Patent Classification* (IPC), da WIPO, a tecnologia a que se refere esta prospecção pertence ao código **C12N 15/06**, como especificado na Tabela 5. Desta forma, os pedidos de patentes serão analisados, além do quantitativo por ano e país requerente e de depósito, quanto à sua classificação IPC.

Tabela 5 – Códigos de patentes utilizados nesta prospecção.

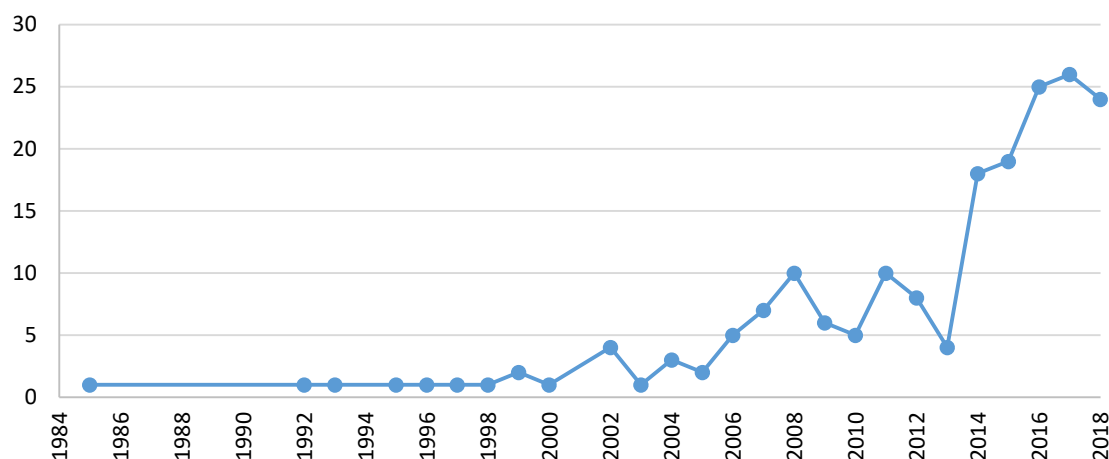
CÓDIGOS	CLASSIFICAÇÃO
C	Química e Metalúrgica
C12	Bioquímica; Cerveja; Álcool; Vinho; Microbiologia; Enzimologia; <u>Engenharia Genética</u> ou de Mutação.
C12N	Micro-organismos ou Enzimas; Suas Composições (biocida, repelentes ou atrativos de pestes, ou reguladores do crescimento de plantas contendo micro-organismos, preparados medicinais, fertilizantes). Propagação, <u>Conservação ou Manutenção de Micro-organismos</u> ; <u>Engenharia Genética</u> ou de Mutações; Meio de Cultura.
C12N 15/00	<u>Mutação ou Engenharia Genética</u> ; DNA ou RNA concernentes à Engenharia Genética, Vetores; uso de seus hospedeiros.
C12N 15/06	<u>Células animais</u>

Fonte: IPC, WIPO, 2019.

Análise das patentes depositadas via PCT na base de dados PATENTSCOPE

Foram analisadas as 158 patentes depositadas via PCT com as palavras chave “*Tribolium castaneum* AND *experimental model*”, como apresentado na Tabela 3. Inicialmente, pode-se observar que o montante de patentes depositadas desde 1985, onde se identificou o primeiro registro, até o ano de 2018, apresenta aumento considerável, demonstrando assim o crescente interesse em utilizar o *T. castaneum* como modelo experimental. É possível observar que 2017 foi o ano em que ocorreu a maior quantidade de depósitos, com 26 pedidos, seguido de 2016, 2018 e 2015 com 25, 24 e 19 depósitos, respectivamente. A partir de 2014 houve um crescente aumento no interesse pelo objeto de estudo, este fato pode ser justificado pelo surgimento de uma onda tecnológica iniciada neste ano, ou seja, provavelmente uma mudança na metodologia e/ou nas tecnologias de produção tenha ocasionado tal ápice (Gráfico 1).

Gráfico 1- Número de patentes por ano na base PatentScope com as palavras chave “*Tribolium castaneum* AND *experimental model*”.

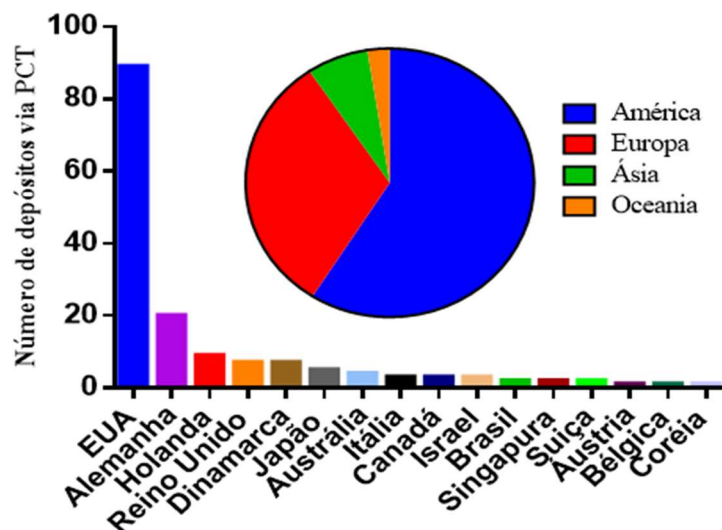


Fonte: Autores, 2019.

A redução no número de patentes depositadas via PCT disponíveis para análise nesta base de dados durante o ano 2018, quando comparada aos anos 2016 e 2017, pode ser justificada pelo fato de serem mantidas em período de sigilo durante 18 meses contados da data de depósito ou da prioridade mais antiga e, por isso, a realização dos estudos de prospecção tecnológica podem sofrer uma limitação, já que um número considerável de depósitos não se encontra disponível em domínio público, sendo tal limitação já relatada em prospecção tecnológica anteriormente desenvolvida (ROCHA et al., 2014). Ressalta-se também que o período de sigilo encobre o que há de mais recente em termos de tecnologia nas diversas áreas do conhecimento e, por isso, parte do ano de 2018 pode não estar corretamente analisado.

Quanto à distribuição dos países com pedidos de depósitos, evidencia-se, através do Gráfico 2, que a tecnologia em estudo se apresenta concentrada, principalmente, nos países desenvolvidos, sendo liderada pelos Estados Unidos da América (EUA) com um total de 89 (56,3 %) pedidos de patentes. Dentre os 16 países detentores desta tecnologia, o Brasil ocupa o 11º lugar, com 2 (1,2 %) depósitos, estando à frente de países como Áustria, Bélgica e República da Coreia, com apenas 1 (0,6 %) depósito de patente via PCT. Quanto à distribuição por continente, América (América do Norte 58 % e América do Sul 1 %) e Europa (31,6 %) detêm a grande maioria dos pedidos de patentes referentes à utilização do *T. castaneum* como modelo experimental. Tal resultado demonstra o interesse de países em buscar modelos alternativos aos mamíferos, considerando que estes apresentam relevantes questões éticas e altos custos na manutenção, sendo substituídos por modelos invertebrados de baixo custo e alta efetividade, como insetos (INSUA et al., 2013).

Gráfico 2 – *Ranking* de países e continentes em função do número de depósitos via PCT para a busca de patentes na base PatentScope com as palavras chave *Tribolium castaneum* AND *experimental model*

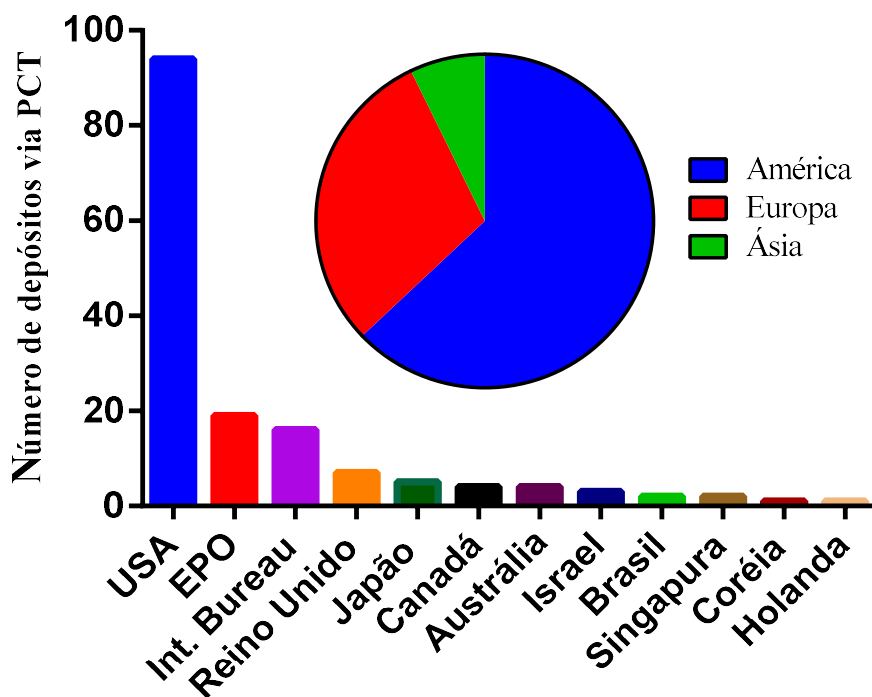


Fonte: Autores, 2019.

Quanto ao país em que foi realizado o pedido de depósito destas patentes, o Gráfico 3 evidencia um cenário semelhante ao anterior. Os EUA é o país que mais realizou pedidos de depósitos (55,9 %) e também o país em que a maior parte destas patentes foram depositadas (59,1 %), demonstrando que grande parte da tecnologia empregada para utilização do *Tribolium castaneum* como modelo para estudos experimentais se encontra concentrada neste país.

Através do gráfico 3, pode-se constatar também que, 11,9 % destes pedidos foram depositados na *European Patent Office* (EPO – Organização Europeia de Patentes), uma organização intergovernamental formada pela aliança entre 27 Estados membros da União Europeia: Alemanha, Áustria, Bélgica, Bulgária, Chipre, Dinamarca, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Estónia, Finlândia, França, Grécia, Holanda, Hungria, Irlanda, Itália, Letónia, Lituânia, Luxemburgo, Malta, Polónia, Portugal, Roménia, Reino Unido, República Checa, Suécia, Suíça, Croácia, Mónaco, a ex-República Jugoslava da Macedónia, Noruega, Turquia, Albânia, Bósnia e Herzegovina, Sérvia e Montenegro. Desta forma, um pedido de patente depositado na EPO oferece proteção para todos os países citados.

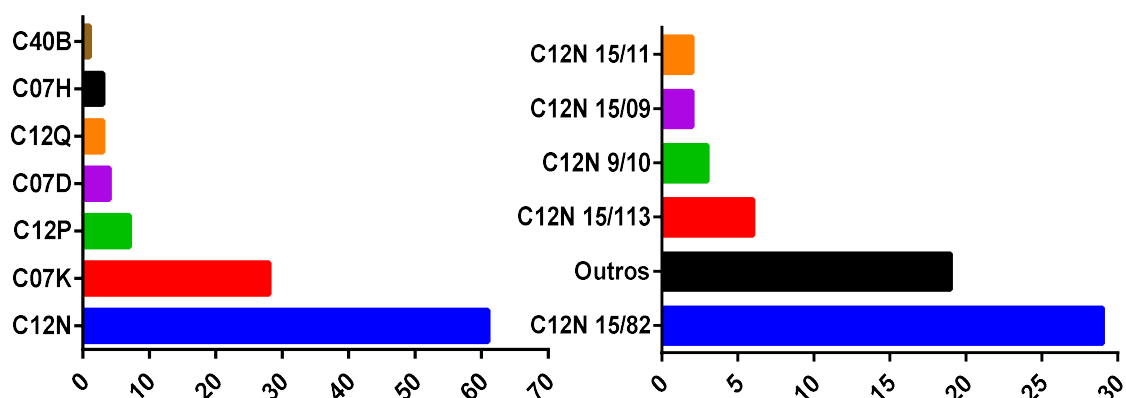
Gráfico 3 – *Ranking* de países e continentes de depósito em função do número de depósitos via PCT para a busca de patentes na base PatentScope com as palavras chave “*Tribolium castaneum* AND experimental model”.



Observa-se também que 10 % dos pedidos de patentes são depositados na *International Bureau*, um departamento vinculado à Cooperação Europeia e Internacional da Agência de Gerenciamento de Projetos DLR no Centro Aeroespacial Alemão. A *International Bureau* é uma organização de serviços que se dedica à promoção de pesquisa, educação e ciência da Alemanha. Desta forma, constata-se que são os países desenvolvidos que detêm o processo de desenvolvimento e o direito legal sobre a exploração desta tecnologia, sendo o continente Americano o detentor de 62,9 % deste uso.

Dos pedidos de patentes resgatados na base PatentScope, a grande maioria encontra-se classificada na Seção C – Química e Metalurgia (67,8 %), seguido por 42 pedidos na Seção A - Necessidades Humanas (26,6 %), 8 pedidos na Seção G – Física (5 %) e apenas 1 pedido na Seção B - Operações de processamento; Transporte (0,6 %). Dentre os 107 pedidos de depósitos na Seção C, ressalta-se que 61 patentes estão classificadas na especificação C12N (57 %), já descrita na Tabela 5. Em análise mais profunda, apresentada no gráfico 4, observa-se que, dentre estas 61 patentes, 29 estão inseridas na especificação C12N 15/82 (47,5 %), porém voltada para utilização em células vegetais. A análise dos códigos e resumos das patentes revelou que tais pedidos se referem principalmente a repelentes de pragas/controle de pragas, o que é explicado pelo fato de o *T. castaneum* ser uma das principais pragas de grãos armazenados com distribuição mundial, considerado uma praga de produtos armazenados de grande importância econômica (FARONI; FRABETTI, 2009).

Gráfico 4 - Classificação IPC dos depósitos de pedidos de patentes via PCT na base PatentScope com as palavras chave “*Tribolium castaneum* AND experimental model”.



Fonte: Autores, 2019.

Os resultados obtidos com a busca de patentes depositadas via PCT da base de dados PatentScope indicam que, apesar de vários pedidos reivindicarem a utilização do *T. castaneum*

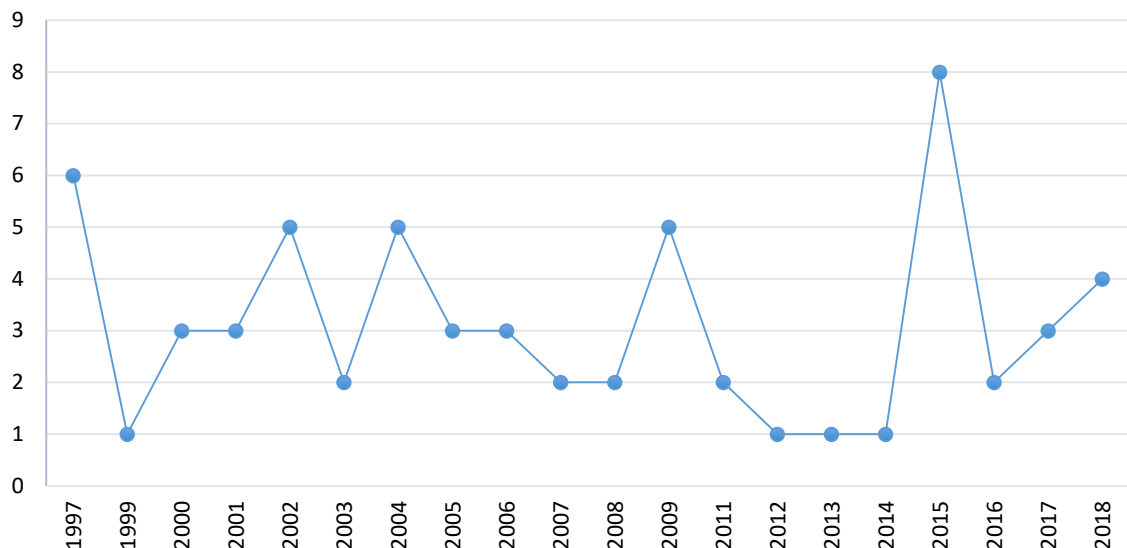
como modelo experimental, nenhum se refere ao estudo do metabolismo de lipídeos e carboidratos, sendo esta uma área tecnológica pouco explorada e potencialmente útil para novas pesquisas.

Análise das patentes depositadas na base de dados ESPACENET

O Espacenet é uma base mundial de acesso livre usualmente utilizada para prospecção e que abrange patentes depositadas em mais de 90 países da América Latina e da Espanha. O resultado da busca nesta base foi apresentado na Tabela 4 e será discutido em dois momentos: com os resultados do termo “Modelo experimental”, onde foram recuperadas 66 patentes, mas sem especificidade para o *Tribolium castaneum*; e com os resultados obtidos a partir da palavra chave “Tribolium castaneum”, com apenas 5 pedidos de patentes.

O gráfico 5 ilustra a análise temporal dos pedidos de depositados recuperados através do termo “Modelo experimental”, com a primeira reivindicação em 1997, porém, com pico em 2015 (8 pedidos de depósitos), reafirmando um avanço tecnológico/metodológico na pesquisa do objeto em específico e/ou um crescimento no interesse de estudos nesta área. Destaca-se também que o baixo número de patentes depositadas no ano 2016 (2 pedidos) pode não refletir a realidade, visto o período de 18 meses de sigilo.

Gráfico 5 - Número de patentes por ano na base Espacenet com a palavra chave “modelo experimental”.



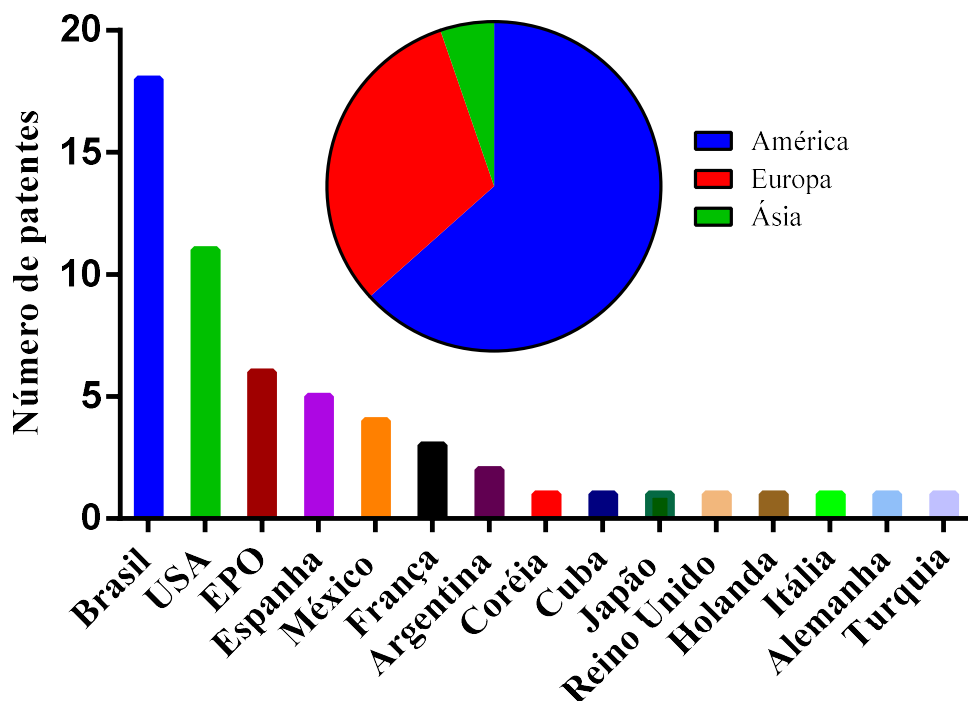
Fonte: Autores, 2019.

Dos 66 pedidos de patentes recuperados nesta base de dados com a palavra chave em destaque, 18 (31,5 %) foram requeridas pelo Brasil, seguida por 11 (19,2 %) pedidos de

depósitos pelos EUA, como demonstra o gráfico 6. A análise mostra que a maioria dos países requerentes pertencem ao continente Americano (63,3 %), destes, 58,3 % foram requeridos por países da América do Sul (Brasil 18, Argentina 2 e Cuba 1 pedido de depósito), 30,5 % pelos EUA e 11,1 % pelo México.

Dos 18 pedidos de depósitos de patentes requeridos pelo Brasil, 13 (72,3 %) foram realizados por Instituições Públicas de Ensino (Estaduais e Federais) e órgãos de fomento à pesquisa e, apenas 5 (27,7 %) foram requeridos por pessoas físicas (não institucionais). Nota-se também que 5 (38,3 %) dos pedidos de depósitos realizados pelas instituições públicas brasileiras ocorreram em 2015, corroborando com a suposição anterior de que algum fato incentivou o aumento das pesquisas nesta área do conhecimento durante este período. Ressalta-se ainda o grande número de pedidos de patentes requeridos por instituições públicas brasileiras, indicando que, mesmo diante do cenário de (sub)financiamento das pesquisas públicas, as universidades ainda são promotoras do desenvolvimento inovador e tecnológico no Brasil.

Gráfico 6 – *Ranking* de países e continentes requerentes das patentes em função do número de depósitos para a busca na base Espacenet com a palavra chave “modelo experimental”.



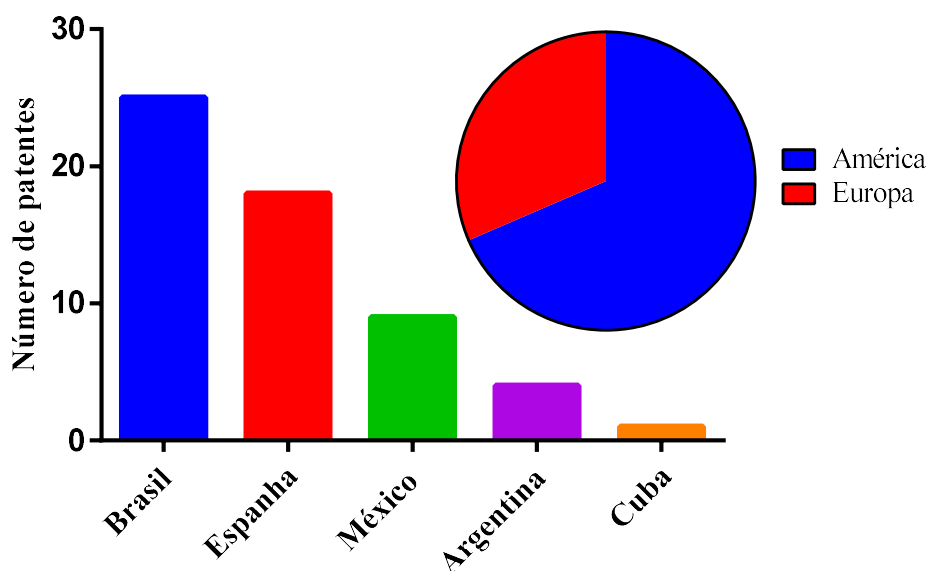
Fonte: Autores, 2019.

Quanto aos países de depósito dos pedidos de patentes, observa-se, através do gráfico 7, que o Brasil, além de ser o principal país requerente, também é o país em que a maior parte

das patentes analisadas foram depositadas (25 depósitos - 43,8 %). Os EUA são responsáveis pelo pedido de 19,2 % das patentes que envolvem “modelos experimentais” depositadas no Brasil, o que demonstra que, além de ser um grande produtor desta tecnologia, o Brasil também é um país com alto potencial para o desenvolvimento de tais métodos e utilizações.

A distribuição dos pedidos de patentes por local de depósito evidencia que a tecnologia produzida principalmente por países desenvolvidos, foi registrada em países em desenvolvimento, concentrados no continente Americano, sendo 9 (15,7 %) depositados na América Latina (México) e 30 (52,6 %) pedidos depositados na América do Sul, contemplando 25 depósitos (43,8 %) no Brasil, 4 (7 %) na Argentina e 1 (1,7 %) em Cuba.

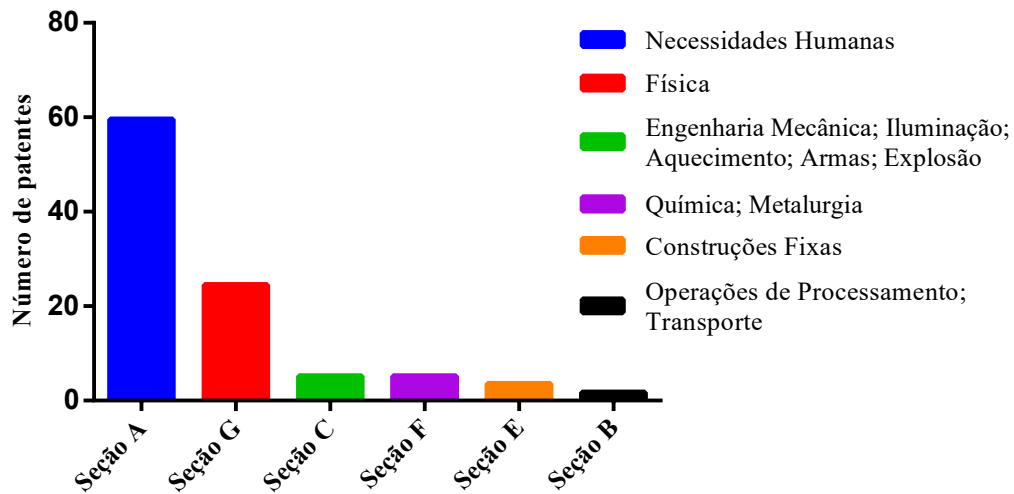
Gráfico 7 – *Ranking* de países e continentes de depósito em função do número de patentes para a busca na base Espacenet com a palavra chave “modelo experimental”.



Fonte: Autores, 2019.

Dentre os pedidos recuperados, 34 (59,6 %) estão inseridos na classificação IPC na Seção A – Necessidades Humanas, enquanto apenas 3 (5,2 %) pedidos estão na Seção C – Química; Metalurgia, conforme o gráfico 8. A maior dispersão das classificações destes pedidos se deve a não especificação de tais Modelos Experimentais. Como esta prospecção se debruça sobre a classificação C12N 15/06, é importante um olhar atento aos 3 pedidos de depósitos classificados na Seção C, porém, constata-se que nenhuma destas patentes foram requeridas na classificação C12: duas estão no grupo C07 (Química Orgânica) e 1 no grupo C09 (Corantes; Tintas; Polidores; Resinas Naturais; Adesivos; Aplicações de Materiais não abrangidos em outros locais).

Gráfico 8 - Distribuição dos pedidos de patentes por Seção na classificação IPC.



Fonte: Autores, 2019.

A pesquisa na base de dados Espacenet utilizando as palavras chave “*Tribolium castaneum*”, como demonstrado na Tabela 4, apresentou apenas 5 resultados. Destes, 2 (40 %) pedidos de depósitos foram requeridos em 1997 pela *Monsanto Technology LLC*, Estados Unidos da América, uma companhia americana especializada no desenvolvimento de tecnologia agropecuária. Porém, um pedido foi depositado na Argentina (composição e método para preparar um inseticida) e outro na Espanha (composições de Cryet29 de *Bacillus thuringiensis* tóxico para espécies de insetos coleópteros). Outro pedido de depósito se refere a um pedido de depósito realizado em 2008, requerido pela *Suntory Holdings LTD*, uma grande empresa japonesa produtora de bebidas, especialmente alcoólicas. Esta empresa japonesa desenvolveu e requereu os direitos sobre os métodos para identificação dos *hábitats* de insetos na Espanha.

Além das proteções citadas, destaca-se o pedido realizado em 2017 pela Universidade de Valencia, Espanha, que se refere a um peptídeo derivado da defensina 3 do *T. castaneum* e suas composições farmacêuticas para uso como antimicrobiano no tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos e no tratamento de câncer, em particular, câncer de mama. O último pedido de patente obtido nesta busca, foi solicitado pela Universidade Autonoma Chapingo, México, em 2018, que reivindica uma composição de diluições agro-homeopáticas dinamizadas feitas de pragas e doenças da cultura do milho para a proteção da cultura do milho de maneira holística.

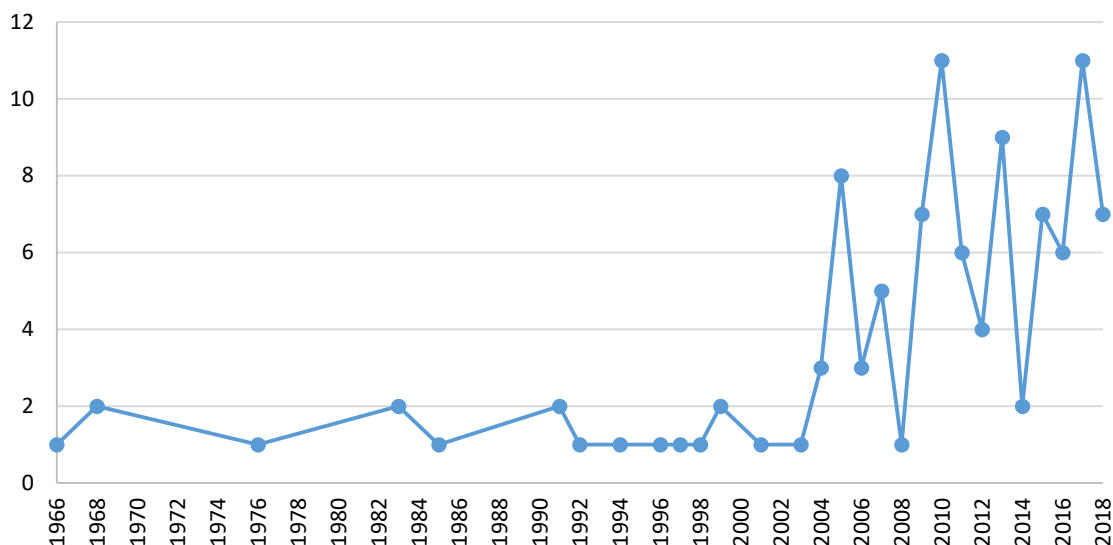
A análise dos pedidos de depósitos de patentes obtidos na base de dados Espacenet, tanto com a utilização das palavras chave “modelo experimental” quanto “Tribolium castaneum”, indica que não há pedido de proteção que se refere à tecnologia analisada nesta prospecção, sendo este um vasto campo a ser explorado, considerando que este inseto apresenta características favoráveis, tais como rápida reprodução, alta fecundidade, intervalos curtos de geração, baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis, genoma acessível em banco de dados, além das sequências de genes apresentarem intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos.

Análise de artigos publicados na base PUBMED

Para análise dos artigos publicados na base de dados PubMed acerca da utilização do *Tribolium castaneum* como modelo experimental para estudo do metabolismo de lipídeos e carboidratos, utilizou-se a combinação de palavras chave “*Tribolium castaneum* AND *experimental model*”, recuperando um total de 130 artigos, já demonstrados na Tabela 3.

Em comparação aos pedidos de patentes via PCT na base PatentScope, usando as mesmas palavras chave, a evolução anual do número de artigos publicados (Gráfico 9) apresenta um panorama mais disperso, com o primeiro artigo publicado em 1966, antecedendo ao primeiro pedido de depósito de patente, que ocorreu em 1985 (Gráfico 1). Em 2010 e 2017 ocorreram picos nas publicações, com 11 artigos lançados, pesquisas estas que podem ter servido de base para as patentes requeridas que obtiveram auge entre 2014 e 2017.

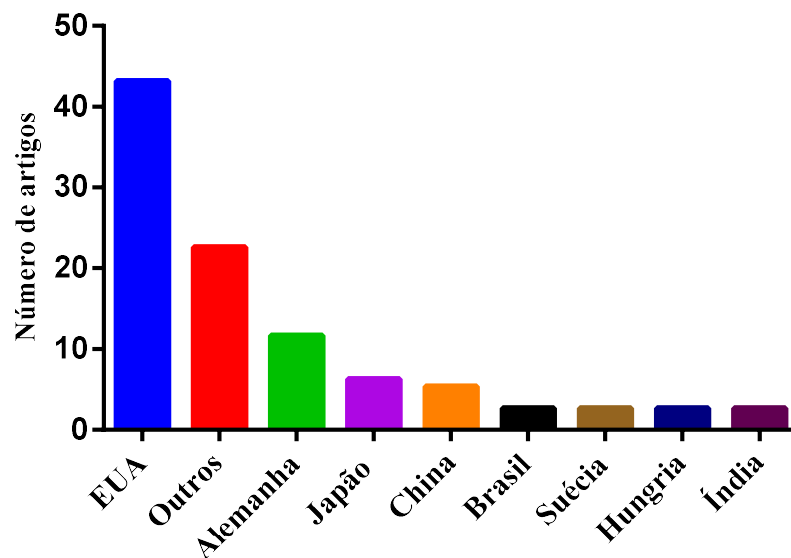
Gráfico 9 - Número de artigos publicados por ano na base de dados PubMed com palavras chave “*Tribolium castaneum* AND *experimental model*”



Fonte: Autores, 2019.

Quanto ao país de filiação do primeiro autor dos artigos (Gráfico 10), observou-se que há similaridade entre os dois países que mais publicam e os que mais requerem o pedido de patentes na base de dados PatentScope (Gráfico 2), sendo o primeiro lugar ocupado pelos EUA, com 48 (43,2 %) artigos publicados, seguido da Alemanha, com 13 (11,7 %) publicações.

Gráfico 10 – *Ranking* dos artigos científicos publicados na base *PubMed* por país do primeiro autor com busca pelas palavras chave “*Tribolium castaneum* AND *experimental model*”



Fonte: Autores, 2019.

No *ranking* das publicações, o Brasil tem 3 (2,7 %) artigos publicados e divide o quinto lugar com países como Suécia, Hungria e Índia, apresentando melhor resultado quando comparado ao número de depósitos de patentes (2 pedidos – 1,2 %), pois apresenta mais artigos do que alguns países que apresentaram maior número de patentes, como Holanda, Reino Unido, Dinamarca, Austrália, Itália, Canadá e Israel. Esta análise permite inferir que, tanto na área de estudo desta prospecção quanto em outras (OLIVEIRA et al., 2017; SOARES; DRUZIAN; LOBATO, 2018; BENEVENUTI; NEI PEREIRA, 2016), a produção científica brasileira continua apresentando perfil técnico, sem uma correspondente produção tecnológica e sua proteção intelectual por meio de depósitos de patentes.

Todos os artigos recuperados nesta busca são provenientes de pesquisas realizadas em instituições de ensino. As três publicações brasileiras foram desenvolvidas em Universidades Públicas da região Sul (Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, e Universidade Estadual de Maringá, Paraná) e Sudeste (Universidade Federal do ABC, Santo André) do país,

o que demonstra que a utilização do *T. castaneum* como modelo experimental é uma tecnologia que ainda não está difundida em todo país, sendo esta uma grande lacuna a ser preenchida.

4.4 Conclusão

A partir da análise das patentes depositadas entre os anos de 1985 e 2017, pode-se concluir que existe uma tendência ao crescimento de depósitos envolvendo a utilização do *T. castaneum* como modelo experimental.

A análise do cenário mundial, através de busca na base de dados PatentScope, constata que são nos países desenvolvidos onde se origina e se detêm a tecnologia patenteada, liderados pelos Estados Unidos da América e Alemanha, estando o Brasil apenas na 11^a posição. Em um contexto mais restrito, analisado por meio de busca na base Espacenet, o Brasil ocupa o primeiro lugar no *ranking* dos pedidos de patentes, evidenciando que tais depósitos são protegidos principalmente no próprio país requisitante.

Cabe ressaltar sobre a limitação desta prospecção no que se refere aos depósitos de patentes requeridos a partir de 2016, pois um número considerável de patentes não se encontra ainda disponível em domínio público, visto que há proteção de sigilo de 18 meses.

Constata-se, através de todas as análises realizadas nas bases de dados PatentScope, Espacenet e PubMed, que não há depósito de pedido de patente que reivindique a tecnologia objeto desta prospecção ou artigo científico que explicita o seu desenvolvimento. Portanto, a utilização do *T. castaneum* como modelo experimental (para estudo do metabolismo de lipídeos e carboidratos) constitui uma área tecnológica pouco explorada e potencialmente útil para novas pesquisas e produtos.

Referências

AKAM, M. Hox and Hom: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. **Cell**. 1989.

BENEVENUTI, C. S. J., NEI PEREIRA, Jr. Prospecção tecnológica da produção de ácido láctico no contexto de biorrefinaria: Tendências e oportunidades. **Espacios**. v. 37, n. 23, p. 10. 2016.

BOMAN, H. G., HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 41, p. 103-126. DOI:10.1146/annurev.mi.41.100187.000535, 1987.

CHOWANSKI, S.; et al. Insect peptides—perspectives in human diseases treatment. **Current medicinal chemistry**. v. 24, n. 29, p. 3116-3152, 2017.

CISNE, J. L. Trilobites and the Origen of Arthropods. **Science**. v. 186, p. 13-18, 1974.

DEMIR, E., DICKSON, B. J. Fruitless splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. **Cell**. v.121, p.785–794. 2005.

DÖNITZ, J., GROSSMANN, D., SCHILD, I., SCHMITT-ENGEL, C., BRADLER, S., PRPIC, N. M., BUCHER, G. Tron: An Anatomical Ontology for the Beetle *Tribolium castaneum*. **Plos One**. v.8, p. 8, 2013.

FARONI, L. R., FRABETTI, D. R. **Principais pragas de grãos armazenados**. Net, Minas Gerais. 2009. Disponível em: <http://www.centreinar.org.br>. Acesso em: 10 set. 2019.

FISHER, R. A. On the Evidence Against the Chemical Induction of Melanism in *Lepidoptera*. **Proceedings of the Royal Society of London**. v. 112, p. 407-416, 1933.

GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. n. 1994, 2007.

GRÜNWARD, S., STELLZIG, J., ADAM, I. V. et al. Longevity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* is enhanced by broccoli and depends on nrf-2, jnk-1 and foxo-1 homologous genes. **Genes & Nutrition**. v. 8, p. 438-448, 2013.

HOY, M. A. **Insect Molecular Genetics: an introduction to principles and applications**. California: Genes, genome organization, and development in insects. 1994.

INSUA, J. L., LLOBET, E., MORANTA, D., PÉREZ-GUTIÉRREZ, C., TOMÁS, A., GARMENDIA, J., BENGOCHEA, J. A. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. **Infect Immun**. v. 81, n. 10, p. 3552-65, 2013.

KEILIN, D. **The History of Cell Respiration and Cytochrome**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1966.

MARANHÃO, Z. G. **Entomologia Geral**. 2. ed. São Paulo: Nobel. 1977.

OLIVEIRA, J. M. S., CAVALCANTI, T. F. S., SOUZA, L. C., PORTO, I. C. C. M., NASCIMETO, T. G., ZANTA, C. L. P. S., UCHOA, S. B. B., TONHOLO, J. Uso de própolis no desenvolvimento de resinas dentárias: um estudo prospectivo. **Cad. Prospec.: Salvador**. v. 10, n. 2, p.285-299, 2017.

RICHARDS, S., GIBBS, R. A., WEINSTOCK, G. M., BROWN, S. J., DENELL, R., BEEMAN, R. W., GIBBS, R., BEEMAN, R. W., BROWN, S. J., BUCHER, G. et al. *Tribolium* genome sequencing consortium. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**. v. 452, p. 949–955, 2008.

ROCHA, I. S., MIRANDA, A. L., AMORIM, F. L., SILVEIRA, P. T. S., SOARES, S. E. Prospecção tecnológica com o enfoque na produção e preparações de alimentos com aroma e sabor de café e cacau. **Revista GEINTEC**. v. 4, n. 4, p. 1418-1425. D.O.I.: 10.7198/S2237-0722201400040015, 2014.

ROTH, T. F., PORTER, R. R. Yolk uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Cell. Biol.** v. 20, p. 313 – 332, 1964.

SAKAI, T., KITAMOTO, T. Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. **Journal of Neurobiology.** v. 66, p. 821–834, 2006.

SCHELLER, K., KARLSON, P. Effects of ecdysteroids on RNA synthesis of fat body cells in *Calliphora vicina*. **J. Insect Physiol.** v. 23, p. 285 – 291, 1977.

SOARES, C. C., DRUZIAN, J. I., LOBATO, A. K. C. L. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do *Bacillus subtilis* em bioprocessos. **Cad. Prospec.** v. 11, p.295-303, Salvador, 2018.

TELFER, W. H. The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. **J. Biophys. Biochem Cytol.** v. 9, p. 747-754, 1961.

TELFER, W. H. The selective accumulation of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. **Biol. Bull.** v. 119, p. 338 – 346, 1960.

5 Método de preparação do inseto *Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae) como modelo de baixo custo para estudo da Síndrome Metabólica

NÚMERO DO PROCESSO: BR 10 2020 009276 6

5.1 Título da Invenção

Método de preparação do inseto *Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae) como modelo de baixo custo para estudo da Síndrome Metabólica

5.2 Objeto da Invenção

A presente invenção remete à aquisição de um novo método de preparação de insetos *T. castaneum*, como modelo invertebrado de baixo custo e alta eficácia, para estudo da Síndrome Metabólica e do efeito de fármacos candidatos nesta disfunção.

5.3 Problema que a invenção se propoe a resolver

Tendo em vista o sucesso no controle de várias doenças transmissíveis em todo o mundo, os interesses têm se voltado às doenças não transmissíveis (DNT), considerando sua alta taxa de morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e em desenvolvimento (OGURTSOVA et al., 2017). No contexto das DNT, destaca-se a Síndrome Metabólica (SM), apontada como importante fator de risco para o desenvolvimento da obesidade, Diabetes Melitus tipo 2 (DM2), acidente vascular cerebral, doenças coronarianas, aterosclerose, dentre outras (SAKLAYEN, 2018).

O atual debate acerca da SM gira em torno da sua correlação com as doenças cardiovasculares, visto que ela se caracteriza como um complexo de distúrbios metabólicos, associado ao alto risco para o desenvolvimento de DM2 e de doenças cardiovasculares (DCV), evidenciado por hiperglicemia, hipertensão, níveis elevados de triglicérides (TG), valores diminuídos da lipoproteína de alta densidade (HDL) e obesidade (VIDIGAL et al., 2013).

Além dos prejuízos individuais à saúde, o aumento da prevalência da SM acarreta elevados custos econômicos e sociais, visto que a estimativa do gasto total deste distúrbio, incluindo os cuidados de saúde e a perda de potencial para atividade econômica, chega a trilhões de dólares. Além disto, em uma pessoa com SM o risco de morte é de duas vezes, e o risco para desenvolvimento de DM2 é de até cinco vezes (VIDIGAL et al., 2013). Como a SM é aproximadamente três vezes mais comum que o diabetes, sua prevalência global é estimada em cerca de um quarto da população mundial, ou seja, mais de um bilhão de pessoas no mundo são afetadas por esta síndrome (SAKLAYEN, 2018).

Diante deste drástico avanço, é emergente que o conhecimento científico acerca da patogênese da SM também avance. Pois, apenas a compreensão de como várias vias metabólicas se (co)relacionam para a gênese deste fenômeno, proporcionará um desenvolvimento significativo nas terapias preventivas, diagnósticas e terapêuticas.

Porém, um desafio atual é a substituição de modelos vertebrados, devido às relevantes questões éticas e altos custos na manutenção, para modelos invertebrados, como insetos (INSUA et al., 2013). O crescente número de pesquisas utilizando insetos como modelo alternativo baseia-se em suas características favoráveis, pois, além de representar uma classe significativa no reino animal, várias espécies apresentam rápida reprodução, alta fecundidade, ciclos de vida curtos que permitem rápidos intervalos de geração, o que facilita os estudos transgeracionais. O fato de serem pequenos favorece a manipulação de seus órgãos, além de possuírem baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis e efeitos sistêmicos e de fácil investigação do RNA de interferência (RNAi), possibilitando o silenciamento gênico. Outro ponto favorável é o genoma acessível em banco de dados para algumas espécies, como é o caso do *Tribolium castenum*, considerado modelo emergente, com sequências de genes que apresentam intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos (RICHARDS et al., 2008; GRÜNWALD et al., 2013).

Tribolium castaneum é um modelo de estudos amplamente utilizado, pois além de dispor das características já descritas, apresenta grande facilidade na incorporação de fatores nutricionais em sua alimentação, colocando-o como importante modelo para estudos de triagem

de fármacos, constituindo uma alternativa importante para a diminuição do uso de vertebrados em laboratórios para testes de *screening* (GRÜNWALD et al., 2013).

Além disto, disfunções como obesidade, hiperglicemia e hipertrigliceridemia, encontradas na Síndrome Metabólica (VIDIGAL et al., 2013), podem ser induzidas e analisadas no inseto praga *T. castaneum*. Desta forma, a invenção aqui discutida propõe à aquisição de um novo método para preparação deste invertebrado como um modelo ideal para estudo desta síndrome.

5.4 Campo de Atuação:

A presente invenção busca a utilização de um método de preparo de insetos *Tribolium castaneum* como modelo de baixo custo e alta eficácia, a ser utilizado por setores da ciência e biotecnologia na obtenção de novos fármacos e no conhecimento da fisiopatologia da Síndrome Metabólica.

5.5 Estado da Técnica

Várias pesquisas utilizaram insetos como modelos experimentais aos quais foram posteriormente observados em mamíferos. Dentre os quais pode-se destacar a observação do processo de seleção natural em mariposas (*Biston betularia*) (FISHER, 1933); a identificação do processo de endocitose mediada por receptores (ROTH; PORTER, 1964; TELFER, 1960 e 1961); a elucidação do mecanismo de ação de hormônios esteróides através de experimentos com ecdisona (SCHELLER; KARLSON, 1977); a descoberta das secropinas, peptídeos antibacterianos (BOMAN; HULTMARK, 1987) e citocromo C (KEILIN, 1966); estudos com *Drosophila melanogaster*, onde através da biologia molecular identificou-se genes homeobox responsáveis por determinar o padrão de organização dos eixos corporais e sua homologia com vertebrados (AKAM, 1989) e estudos genéticos e moleculares que apontaram os locais do Sistema Nervoso Central relevantes para comportamentos sexuais masculinos (DEMIR; DICKSON, 2005; SAKAI; KITAMOTO, 2006).

Desta forma, vem sendo mais frequente a realização de estudos buscando a utilização de insetos como modelos experimentais alternativos, resultando em achados que possam ser reproduzíveis em vertebrados (INSUA et al., 2013). Assim, o *Tribolium castaneum*, importante praga de grãos armazenados, tem sido a segunda escolha como sistema modelo para estudos em insetos, ficando atrás apenas da mosca-da-fruta *D. melanogaster*, que lidera as pesquisas na área de genética (DÖNITZ et al., 2013).

O sucesso observado com a utilização do *T. castaneum* se deve à rápida reprodução, alta fecundidade, intervalos curtos de geração, baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis, genoma acessível em banco de dados, além das sequências de genes apresentarem intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos, compartilhando com estes cerca de 126 grupos de genes ortólogos (RICHARDS et al., 2008).

Devido à alta homologia observada entre o *T. castaneum* e humanos e o alto grau de conservação em sequências com domínios característicos de famílias de proteínas, muitos estudos têm sido realizados utilizando este inseto como modelo, como por exemplo estudos de interação entre fatores nutricionais e expressão gênica, utilizando genes homólogos, além da sua utilização em testes de *screening* (GRÜNWALD et al., 2013).

Pesquisa sobre o metabolismo lipídico de *Rhodnius prolixus* (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM; 2007) elucidou pontos sobre o processo digestivo e metabolismo de lipídios em insetos, inferindo que tais mecanismo ocorrem de forma análoga à dos mamíferos. Tal informação, associada às características específicas do *Tribolium castaneum*, colocam-no como modelo experimental ideal para estudos do metabolismo de lipídios e carboidratos, assim como de disfunções como a Síndrome Metabólica.

Considerado uma das principais pragas secundárias de grãos armazenados, principalmente de cereais como milho, arroz e trigo, com distribuição mundial, o *T. castaneum* (Coleóptero: Tenebrionidae) é responsável por grandes perdas econômicas no setor de produtos (FARONI; FRABETTI, 2009; SCHMIDT-OTT; LYNCH, 2016). Também conhecido como besouro vermelho da farinha, devido sua coloração castanho-avermelhada, é um inseto holometábolo, ou seja, passa por metamorfose completa em seu desenvolvimento. O ciclo de vida médio deste inseto compreende 30 a 40 dias, quando em condições ideais: umidade relativa de 76,5 % e temperatura máxima de 30,6 °C (DEVI; DEVI, 2015).

As larvas de *T. castaneum* possuem o último segmento abdominal com uma bifurcação, passando por 7 ínstars, em média, até chegarem à fase de pupa. A pupa tem olhos totalmente desenvolvidos, não têm um casulo e nos primeiros dias é branca e, gradualmente, passa para a cor amarela até, finalmente, chegar à cor castanha. Cada fêmea adulta pode colocar de 150 a 600 ovos, a 25 °C e 32 °C, respectivamente, com uma média de 6 ovos por dia durante 2 meses (BALDWIN; FASULO, 2003).

Este inseto foi o primeiro besouro a ter o genoma sequenciado, em 2008, por Richards e colaboradores, colocando-o como modelo promissor para estudos gênicos (BENTON; PAVLOPOULOS, 2014; ZHU et al., 2013). Outra característica favorável ao *T. castaneum* é a intensa relação de homologia de genes com outras espécies, incluindo humanos. Devido à alta

homologia observada entre o *T. castaneum* e humanos, e o alto grau de conservação em sequências com domínios característicos de famílias de proteínas, muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando este inseto como modelo, a exemplo de estudos de interação entre fatores nutricionais e expressão gênica, utilizando genes homólogos (RICHARDS et al., 2008).

Outras características deste inseto, como rápida reprodução, alta fecundidade, intervalos curtos de geração, baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis e serem pequenos, com tecidos observáveis em todos os estágios de desenvolvimento, favorecem estudos transgeracionais como o desenvolvido por Bingsohn, Knorr e Vilcinskis (2016), que utilizaram este modelo para determinar os efeitos colaterais epigenéticos transgeracionais causados pelo Ácido Psicoativo Valpróico, que é um inibidor da histona desacetilase e a curcumina, um antioxidante inibidor da histona acetiltransferase. Os resultados foram além dos encontrados em modelos vertebrados e ensaios clínicos em humanos, indicando efeitos transgeracionais mais duradouros de ambos os fármacos, sugerindo, assim, o *Tribolium* como um modelo ideal de alerta precoce para indicar potenciais fatores de riscos epigenéticos transgeracionais associados aos fármacos.

A intrínseca relação de homologia gênica entre *T. castaneum* e vertebrados, como humanos, pode ser comprovada por estudos como o de Yu et al. (2013), que caracterizaram neste inseto a presença de neuropeptídeos homólogos aos mamíferos (Sulfaquinina), como a gastrina/colecistoquinina, elucidando aspectos envolvidos no controle da ingestão de alimentos.

Todas as características deste inseto têm o colocado como importante modelo experimental a ser explorado. Comprova-se tal informação a partir dos resultados obtidos em prospecção tecnológica realizada por SILVA et al. 2019, que objetivou analisar patentes das bases PatentEscope e Espacenet e artigos da base PubMed, que correlacione a utilização do *T. castaneum* como modelo experimental para estudos do metabolismo de lipídeos e carboidratos. Nesta prospecção, chegou-se à conclusão de que, nas bases analisadas, não há pedidos de patentes ou artigos científicos que descrevam uma maneira de se preparar insetos *T. castaneum* para esta finalidade, sendo portanto uma área tecnológica pouco explorada e potencialmente útil para novas pesquisas e produtos.

Em revisão feita por Wong et al., em 2016, sobre os modelos animais utilizados no estudo da Síndrome Metabólica, comprova-se que o principal modelo utilizado é o murino (ratos e camundongos), com destaque para os roedores Sprague-Dawley, ratos Wistar, ratos C57BL/6J e Golden Syrian Hamster, em que se induz à disfunção por mecanismos dietéticos, genéticos ou farmacológicos, com uma variação de 4 a 40 semanas. Além das questões éticas e

elevado custo de manutenção deste modelo, aponta-se para o alto tempo de indução e pequeno número de indivíduos como pontos negativos observados.

De forma semelhante, um método de preparo em mamífero vertebrado (macaco Rhesus) para estudo da Síndrome Metabólica já foi protegido pelo pedido CN103355254A, solicitado por Chen Younan e colaboradores, em 2013. Porém, a proposta apresenta alguns problemas, como baixo número de indivíduos a ser estudado por vez, dificultando a representatividade dos dados obtidos; graves aspectos éticos ao se propor uso de primatas como modelo; longo tempo de pesquisa, considerando que cada análise deve utilizar macacos de 18 meses e a indução à condição análoga à Síndrome Metabólica será feita durante 6 meses, elevando ainda os custos dos estudos. Desta forma, as características do modelo invertebrado se sobrepõe em todos os pontos negativos destacados.

Quanto à utilização do método utilizando *T. castaneum* para estudo de possíveis fármacos candidatos no tratamento da Síndrome Metabólica, destaca-se a invenção de um método de *screening* dos efeitos das nanopartículas na função e integridade da barreira cerebral, sob o número DK177379B1 de 2012, que utiliza insetos como modelo animal. De modo semelhante, a invenção protegida pelo número WO186559A1 de 2016, também propõe o uso de insetos como modelo na investigação das propriedades de barreiras sangue-cérebro e metabolismo cerebral, demonstrando assim a emergente importância desta classe animal nas pesquisas biotecnológicas.

Diante deste cenário, considerando as várias qualidades dos insetos enquanto modelo de pesquisas sobre desordens metabólicas e *screening* de fármacos para esta finalidade, somados à necessidade de avançar em estudos da Síndrome Metabólica, saindo de modelos vertebrados, mamíferos ou não, esta invenção apresenta a proposta de desenvolvimento de um novo método para preparação de insetos *T. castaneum*, como modelo invertebrado de baixo custo e alta eficácia, para estudo da Síndrome Metabólica e do efeito de fármacos candidatos nesta disfunção.

5.6 Descrição da Técnica:

A presente invenção busca o desenvolvimento de um novo método para preparação de insetos *T. castaneum*, como modelo invertebrado de baixo custo e alta eficácia, para estudo da Síndrome Metabólica e do efeito de fármacos candidatos nesta disfunção.

A indução do inseto a uma condição análoga à SM pode se dar através da incorporação de lipídios à dieta base, preferencialmente o azeite de oliva.

O estudo da SM e do efeito de fármacos candidatos pode se dar através da utilização deste inseto em diferentes fases do seu desenvolvimento, porém, entende-se que a fase larval seja a mais adequada, pois apresenta padrão de ingestão alimentar constante.

A forma de apresentação dos fármacos candidatos podem ser variadas e estes serão incorporados à dieta base por meio de maceração.

Assim, os passos seguintes são pertinentes aos experimentos realizados na obtenção do método para induzir larvas de *T. castaneum* à condição análoga à SM e as técnicas analíticas do efeito de uma fármaco estimulante da lipólise, o Fenofibrato.

Insetos

Os insetos *T. castaneum* utilizados nesta pesquisa pertencem à colônia mantida no Laboratório de Bioquímica Metabólica - LBM, da Universidade Federal de Alagoas - UFAL. Os insetos foram mantidos na dieta base (farinha de trigo) a 30 °C, entre 70 e 80 % de umidade relativa e fotoperíodo claro/escuro. Larvas sincronizadas com aproximadamente 15 dias (L-15) após a postura foram utilizadas.

Padronização da dieta *high fat*

Como forma de induzir as larvas à condição de hipertrigliceridemia, inicialmente padronizou-se uma dieta *high fat* a partir de três formulações da dieta base: Dieta 1: óleo de soja (15 %); Dieta 2: óleo de oliva (15 %); Dieta 3: óleo de coco (15 %), comparado ao grupo controle, mantido em dado base. Os componentes de cada formulação foram incorporados à dieta base por maceração. Grupos de 20 larvas foram mantidas por 168 horas nas dietas suplementadas para avaliar a sobrevivência através da curva de Kaplan-Meier, após esse período, os triacilgliceróis do corpo gorduroso foram analisados. Após análise das variáveis, escolheu-se a dieta *high fat* que provocasse menor mortalidade e maior aumento dos níveis de triacilglicerol.

Dieta suplementada com fenofibrato

O estimulante da lipólise, fenofibrato 200 mg, foi adicionado à dieta base por maceração, obtendo-se uma concentração final de 0,01g de fenofibrato/1g de farinha. Após manter as larvas por 168 horas na dieta *high fat*, elas foram transferidas para uma dieta suplementada com fenofibrato 1% ou uma dieta base por 120 horas. A manutenção das larvas nas dietas suplementadas foi realizada em triplicata, comparando os resultados obtidos com o grupo controle.

Peso corporal e índices nutricionais

As larvas, por grupo de análise, foram pesadas em uma balança de alta precisão (Shimadzu AUY-220, UniBloc) antes de serem expostas a dietas suplementadas e após o período determinado para cada dieta. Pesou-se também as microplacas com as dietas antes da inserção das larvas e após o período determinado. Os índices nutricionais foram calculados a partir das fórmulas de Taxa de Crescimento Relativo (TGR), Taxa de Consumo Relativo (TCR) e Eficiência de Conversão de Alimentos Ingeridos (ECI) (XIE et al., 1996), considerando o seguinte: $TGR = \text{mg de biomassa adquirida} / (\text{mg de biomassa inicial do inseto} \times \text{dia})$; $TCR = \text{mg de biomassa ingerida} / (\text{mg de biomassa inicial do inseto} \times \text{dia})$; $ECI (\%) = \text{biomassa adquirida} / (\text{alimento ingerido} \times 100)$.

Extração da hemolinfa

Uma quantidade igual de 45 larvas por grupo foi lavada e seca e, em seguida, um pequeno orifício foi feito abaixo do segundo segmento dorsal de cada uma, usando uma agulha. Cinco larvas de cada vez foram acomodadas em um ependorf de 200 μl modificado (com 5 pequenos orifícios na base) para permitir a drenagem da hemolinfa. Em seguida, o ependorf modificado foi acomodado em um segundo ependorf de 500 μl , para que a hemolinfa pudesse ser adequadamente coletada. Após este procedimento, realizou-se centrifugação de 3000 g por 15 segundos. O volume total coletado variou entre 4-6 μl e foi homogeneizado em 100 μl de solução salina a 0,9 % mantida sob refrigeração, sendo então centrifugado por 15 minutos a 3000 g para separar o precipitado, que foi descartado, sendo o sobrenadante usado para as seguintes dosagens.

Quantificação do colesterol total da hemolinfa

Após quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) e normalização para 20 μg de proteínas, as amostras foram analisadas pelo kit comercial Bioclin, usando o reagente específico para colesterol número 2, montado na placa de 96 poços, que foi incubada por 10 minutos a 37 °C, para análises posteriores em comprimento de onda de 500 nm em um leitor Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA). Os valores de absorbância obtidos foram convertidos para a concentração usando uma curva padrão para o colesterol total. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata e o branco foi feito com reagente na ausência de uma amostra. Os valores de colesterol foram expressos no gráfico como μg de colesterol/ μg de proteína.

Quantificação de açúcares totais

A quantificação dos açúcares totais foi determinada pelo método fenolsulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956). 20 larvas por grupo foram lavadas e secas, maceradas em 300 µl de ácido perclórico e centrifugadas a 3000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um ependorf. Utilizou-se 10 µL deste sobrenadante para preparar a solução, adicionando 190 µL de ácido perclórico. Foram adicionados 30 µL desta solução, 30 µL de fenol a 5 % e 140 µL de ácido sulfúrico a cada poço, numa placa de 96 poços, em triplicata. A placa foi incubada por 10 minutos a 37 °C, para posterior análise em um leitor Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 490 nm. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos para a concentração através de uma curva de calibração obtida usando a glicose como padrão.

Quantificação de triacilglicerol

O corpo gordo de aproximadamente 10 larvas de cada grupo de análise foi macerado em 400 µL de solução salina a 0,9 % e o homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. Depois disso, o sobrenadante foi removido e armazenado como uma amostra para análise em um microtubo identificado. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e o volume correspondente a 20 µg de proteína de cada extrato foi utilizado para medir o triacilglicerol (TAG). A quantificação do TAG foi realizada utilizando o kit comercial Bioclin, utilizando as amostras obtidas e o reagente específico, montado na placa de 96 poços, que foi incubada por 10 minutos a 37 °C, para posterior análise em um leitor Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) com um comprimento de onda de 500 nm. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em concentração usando uma curva padrão para triacilglicerol. Todas as dosagens foram realizadas em triplicado e o branco foi feito com reagente na ausência de uma amostra. Os valores da concentração de TAG foram expressos no gráfico como µg de TAG/µg de proteína.

Análise da atividade TAG-lipase

A atividade da enzima TAG-lipase foi verificada de acordo com Choi, Hwang e Kim (2003) no corpo gorduroso e intestino das larvas do grupo controle e expostas às dietas suplementadas. Para isso, foram adicionados 200 µl do substrato (tecido homogeneizado em solução salina a 0,9%) na mistura de reação padrão (20 µL de DMPTB 10 mM, 20 µL de DTNB 40 mM, 2 µl de EDTA 0,5 M, 5 µl de EDTA 0,5 M, 5 µl de Triton X-100 10% e 50 µL de Tris-Cl 1 M, pH 7,5, completado com 803 µl de água deionizada para produzir um volume final de

900 µl). A lipase de *Candida rugosa* (Sigma L1754, 724 U / mg de proteína, ST. Louis, EUA) foi dissolvida ou diluída com tampão L (KCl 10 mM, Tris-Cl 10 mM, pH 7,5). Os poços de microplaca foram preenchidos com 10 µg da enzima e completados com 200 µl desta mistura com substrato. Para a detecção específica da atividade da lipase nos extratos de tecido bruto, foi utilizado um branco que não continha DMPTB. A microplaca foi transferida imediatamente para uma incubadora a 37°C para iniciar a reação. Após o período de incubação de 30 minutos, a absorbância foi medida a 405 nm usando um leitor de microplacas Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA). Os resultados dessa atividade enzimática foram calculados a partir das absorbâncias obtidas pela equação: $\{[(\text{teste de absorbância} - \text{absorbância branca}) * 200] / \text{tempo de incubação (min)}\} / \text{coeficiente de extinção molar } (13,6\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$. Os resultados foram apresentados em gráficos em Unidades/mol/min/mL.

Análise da expressão gênica

Extração de RNA total

Cabeças de 10 larvas por grupo foram homogeneizadas em 500 µl de reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em tubos de microcentrífuga e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 13.000 g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e 200 µl de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados a eles. As amostras foram incubadas por 2 minutos em temperatura ambiente e novamente centrifugadas a 13.000 g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos e foram adicionados 500 µl de isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e depois centrifugadas a 13.000 g a 4 °C por mais 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em 200 µl de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha), quando as amostras foram armazenadas. O RNA foi ressuspenso em 20 µl de H₂O-DEPC a 0,1% e congelado (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

Dosagem de RNA

As amostras de RNA foram quantificadas em um espectrofotômetro L-quant (Loccus, Cotia, BRA) e avaliadas quanto à pureza através da análise da razão entre a absorbância observada no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. As amostras foram consideradas adequadas para uso quando a razão 260/280 foi maior que 1,8 e menor que 2 (LEHNINGER et al., 2004).

Síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Thermo Fisher Scientific) para remover a contaminação por DNA genômico. Em um tubo de 0,2 mL no gelo, 1 µg de RNA total, 1 µL de tampão DNase I (10x), 1 µL de DNase I (1 U / µL) e H₂O-DEPC 0,1% foram adicionados o suficiente para completar 10 µL. As reações foram incubadas por 30 minutos a 37 °C no termociclador (Thermal Cycler, Bio-Rad), após esse período, foram adicionados 1 µL de EDTA 50mM e a reação foi novamente incubada a 65 °C por 10 minutos. Para a síntese de cDNA dos genes analisados, foi utilizado o Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Aos 11 µL obtidos no tratamento das amostras com DNase I foram adicionados 2,2 µL do tampão de reação (10x), 0,88 µL de dNTP (100 mM), 2,2 µL de iniciadores aleatórios (10x), 1,1 µL de transcriptase reversa (50 U / µL) e H₂O-DEPC 0,1% para completar 22 µL. As reações foram incubadas por 10 minutos a 25 °C, depois a 37 °C por 2 horas e terminando em 5 minutos a 85 °C no termociclador. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até o uso.

PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas em um termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O Kit Master Power SYBR® Green PCR (Applied Biosystems) foi utilizado, em uma placa óptica de 96 poços, seguindo o protocolo determinado para uma reação de PCR com um volume final de 15 µL: 7,5 µL do Kit Master Power SYBR® Green PCR (2x), 3 µL da amostra de cDNA diluída (5x), 0,2 µL do primer Forward (10 µM), 0,2 µL do primer Reverse (10 µM) e H₂O milli-Q autoclavados para completar o volume final. O branco foi realizado sem o cDNA, substituindo o volume por H₂O milli-Q. Os pontos brancos e experimentais foram realizados em triplicata. O programa de variação de temperatura utilizado foi: 1 ciclo a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 45 segundos, seguido pela curva de fusão. Os genes analisados e os iniciadores utilizados neste estudo estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Gene, número de acesso (NCBI)/referência, sequência de *primers* e tamanho dos fragmentos amplificados pelos *primers* utilizados.

Gene/Símbolo	Número acesso (NCBI) / Referência	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do amplicon (pb)
Sulfaquinina (TcasSK)	EFA04708.1	F-GGCAGCGATTAAGCCAATAA R-TGCAAAATTTATTACCAGCCATT	~200
Peptídeo Semelhante à Insulina 2 (TcasILP2)	SHENG et al., 2011	F- TTACGTCTGGTCTTCACCGCACAT R-TGGTTGGGTTTGGATTCTGGAGAGT	~200
Proteína Ribossomal S3 (TcasPS3)	NP_001165863.1	F-CCGTCGTATTCGTGAATTGACTT R-TCTAAGAGACTCTGCTTGTGCAATG	~200

Fonte: Autores, 2020.

Análise de dados RT-qPCR

Os valores de $\Delta\Delta Ct$ e a quantidade relativa de expressão foram calculados a partir dos valores de Ct ("ciclo limite", que é o número de ciclos necessários para produzir uma quantidade definida de fluorescência), obtido por PCR em tempo real (NORGARD et al. 2006). Esses valores foram utilizados para a análise estatística específica de cada experimento, conforme indicado nas legendas das figuras. Os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram utilizados apenas para montar os gráficos.

Análise estatística

Os dados foram catalogados e analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism[®]. As diferenças estatísticas entre os dados paramétricos e não paramétricos foram determinadas pela análise de variância ANOVA unidirecional ou bidirecional, assumindo significância quando $p < 0,05$.

5.7 Resultados Obtidos:

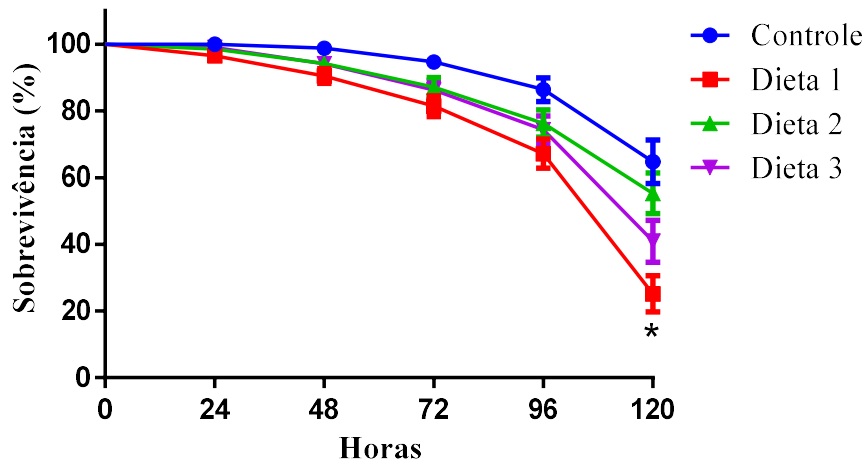
Padronização da dieta *high fat*

Como forma de se padronizar um novo método para estudo da SM em larvas de *T. castaneum*, houve inicialmente a necessidade de se padronizar uma dieta suplementada. Foram testadas três formulações: Dieta 1: óleo de soja a 15%; Dieta 2: óleo de oliva a 15%; Dieta 3: óleo de coco a 15%.

Analisou-se a taxa de sobrevivência e quantificação de triacilglicerol do corpo gorduroso das larvas, visto que, para atender às necessidades deste estudo, a dieta *high fat* deve ser capaz de induzir a hipertrigliceridemia, condição associada à SM, sem provocar grande mortalidade dos grupos analisados.

Assim, após um período de exposição de 120 horas, identificou-se, através da curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (Figura 13), que as larvas expostas à Dieta 1 apresentaram taxa de sobrevivência significativamente menor quando comparada ao grupo controle.

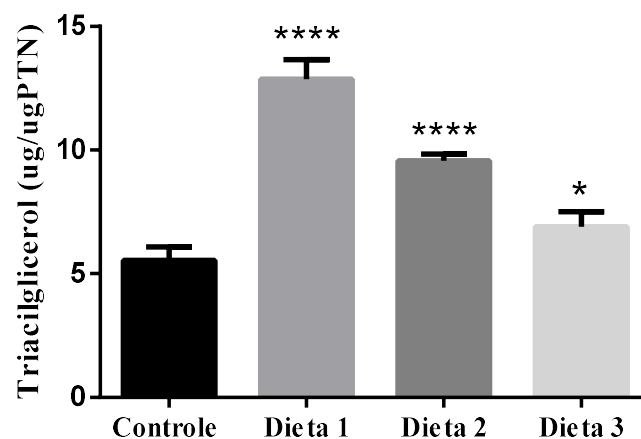
Figura 13 - Curva de sobrevivência de Klapan-Meier das larvas expostas às dietas suplementadas por 120 horas, comparadas ao grupo controle. As barras representam média \pm desvio padrão de 3 determinações. *: Significativamente diferente por teste de ANOVA *one way*, $p < 0,05$.



Fonte: Os autores, 2020.

Os níveis de triacilglicerol presentes em homogenatos de larvas mostraram aumento estatisticamente significativo na Dieta 1 ($11,01 \pm 1,2$) e Dieta 2 ($9,56 \pm 0,27$) quando comparadas ao grupo controle ($5,54 \pm 0,54$). As larvas expostas à Dieta 3 ($6,9 \pm 0,59$) não apresentaram aumento significativo do triacilglicerol acumulado, como demonstrado na Figura 14.

Figura 14 - Quantificação de triacilglicerol do corpo gorduroso de larvas expostas às dietas suplementadas por 120 horas, frente ao controle. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente por teste de ANOVA *one way*, $p < 0,05$.



Fonte: Os autores, 2020.

Observa-se que a Dieta 1 apresentou taxa de sobrevivência significativamente baixa, apesar da alta quantificação de triacilglicerol, não sendo, portanto, considerada uma boa dieta

padrão. Já as larvas expostas às formulações 2 e 3 apresentaram taxa de sobrevivência próxima ao controle, porém, os insetos submetidos à Dieta 2 apresentaram quantificação de triacilglicerol 72,6 % maior que o grupo controle, enquanto a Dieta 3 aumentou apenas em 24 %.

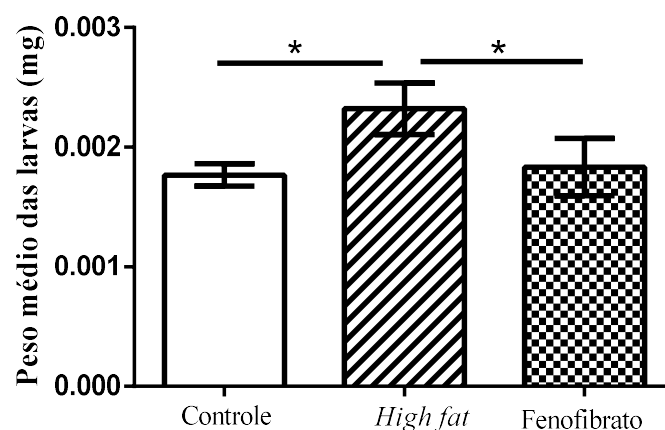
Desta forma, ponderando sobre as variáveis analisadas, optou-se por utilizar a Dieta 2 (óleo de oliva 15 %) como padrão *high fat* para indução da hipertrigliceridemia em larvas de *T. castaneum* para os experimentos seguintes.

Sabendo que o aumento da oferta lipídica provoca alterações capazes de interferirem em vários processos metabólicos (VIDIGAL et al., 2013), buscou-se identificar se a suplementação de óleo de oliva a 15 % na dieta destes insetos, além de aumentar em mais de 70 % os níveis de triacilglicerol, condição análoga à hipertrigliceridemia, também proporciona outras alterações, tais como o aumento do peso corporal, dislipidemias, hiperglicemia e aumento da resistência à insulina.

Dieta *high fat* provoca aumento do peso de *T. castaneum*

As larvas mantidas por 168 horas em uma dieta suplementada com óleo de oliva a 15 % apresentaram um ganho de peso de 68,8 % maior que as larvas do grupo controle. Ao analisar os efeitos da mudança na dieta, observou-se que a manutenção por 120 horas em dieta base não causou uma redução significativa no peso dessas larvas, no entanto, a adição de fenofibrato 1 % alcançou uma diferença significativa (Figura 15).

Figura 15 – Peso final das larvas após exposição à dieta *high fat* por 168 horas e então transferidas para dieta suplementada com fenofibrato por 120 horas. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente por teste de ANOVA *one way*, $p < 0,05$.

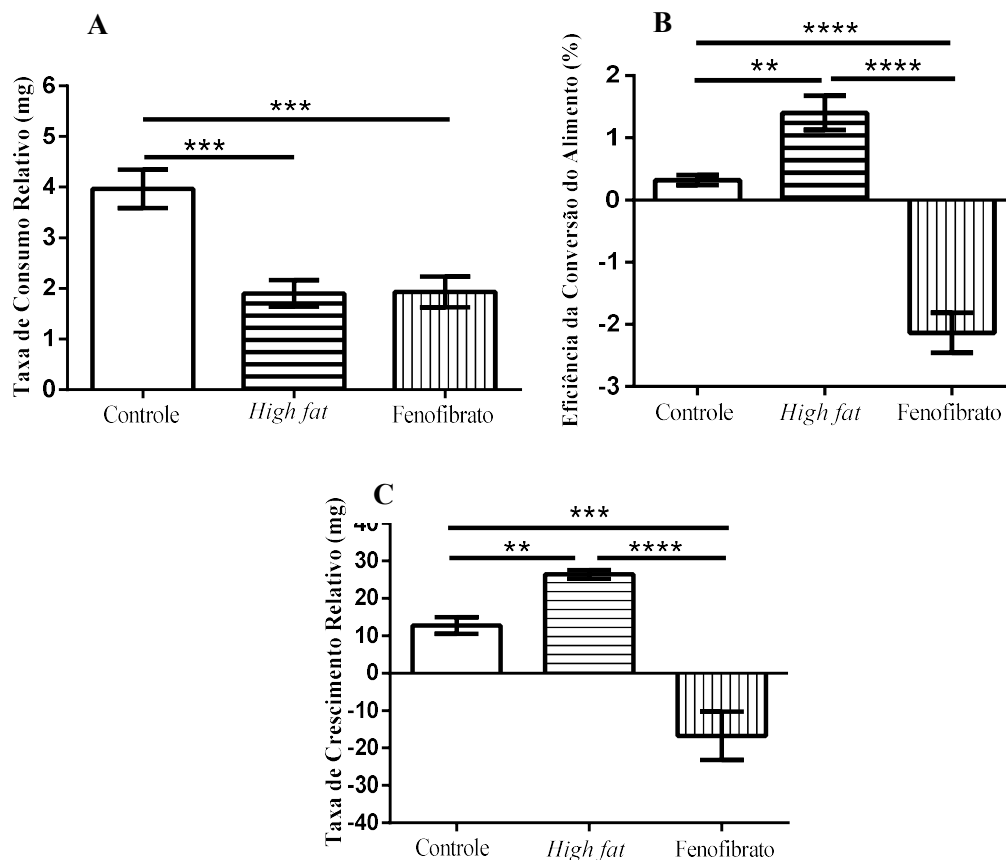


Fonte: Os autores, 2020.

O ganho de peso das larvas expostas à dieta hiperlipídica justifica-se pelo alto valor calórico e não pelo aumento da quantidade ingerida, o que é confirmado pela diminuição da Taxa de Consumo Relativo - TCR (Figura 16A) (controle: $3,9 \pm 0,3$ x *high fat*: $1,9 \pm 0,2$), no entanto, o aumento significativo na Eficiência de Conversão dos Alimentos Ingeridos - ECI (Figura 16B) (controle: $0,3 \pm 0,08$ x *high fat*: $1,4 \pm 0,27$) levou a um melhor uso/absorção de alimentos, refletido no aumento considerável da Taxa de Crescimento Relativo - TGR (Figura 16C) (controle: $12,7 \pm 2,2$ x *high fat*: $26,4 \pm 1,1$), explicando o ganho de peso nessas larvas.

Por outro lado, as larvas mantidas em uma dieta suplementada com fenofibrato, comparadas às larvas que retornaram à dieta base, comeram menos, com menor TCR (Figura 16A), apresentaram menor ECI (Figura 16B), o que refletiu na redução da TGR (Figura 16C), ou seja, a mudança alimentar estimulou uma condição catabólica, evidenciada mais fortemente pela ação da droga.

Figura 16 - Índices nutricionais de larvas após 168 horas em dieta *high fat* comparados ao grupo controle, e então transferidas para dieta suplementada com fenofibrato por 120 horas: (A) TCR = taxa de consumo relativo; (B) ECI = eficiência da conversão de alimento ingerido; (C) TGR = taxa de crescimento relativo. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente por teste de ANOVA *one way*, $p < 0,05$.



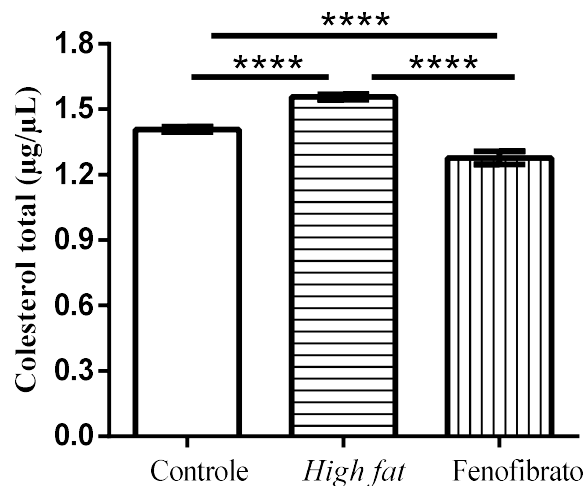
Fonte: Os autores, 2020.

Assim, sabe-se que o aumento da oferta lipídica ocasionou, além da hipertrigliceridemia, o aumento de peso em larvas expostas à dieta *high fat*, associado à Síndrome Metabólica. Diante disto, buscou-se avaliar se esta interferência alimentar também altera o metabolismo lipídico destes insetos.

Dieta *high fat* provoca hiperlipidemia em larvas de *T. castaneum*

Já foi constatado inicialmente, que o aumento da oferta lipídica provoca aumento do conteúdo de triacilglicerol armazenado no corpo gorduroso destas larvas (Figura 13), causando hipertrigliceridemia. Além disto, comprova-se também que a suplementação com lipídios ocasionou aumento na dosagem de colesterol total quantificado a partir da hemolinfa das larvas (controle: $1,4 \pm 0,01$ x *high fat*: $1,5 \pm 0,01$), mas a mudança de larvas para uma dieta suplementada com fenofibrato reduziu os níveis de colesterol total abaixo dos níveis ($1,2 \pm 0,03$), como mostrado na Figura 17.

Figura 17 - Quantificação de colesterol total da hemolinfa de larvas mantidas por 168 horas em dieta *high fat* frente ao grupo controle, e então transferidas para dieta suplementada com fenofibrato. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente por ANOVA *one way*, $p < 0,05$.



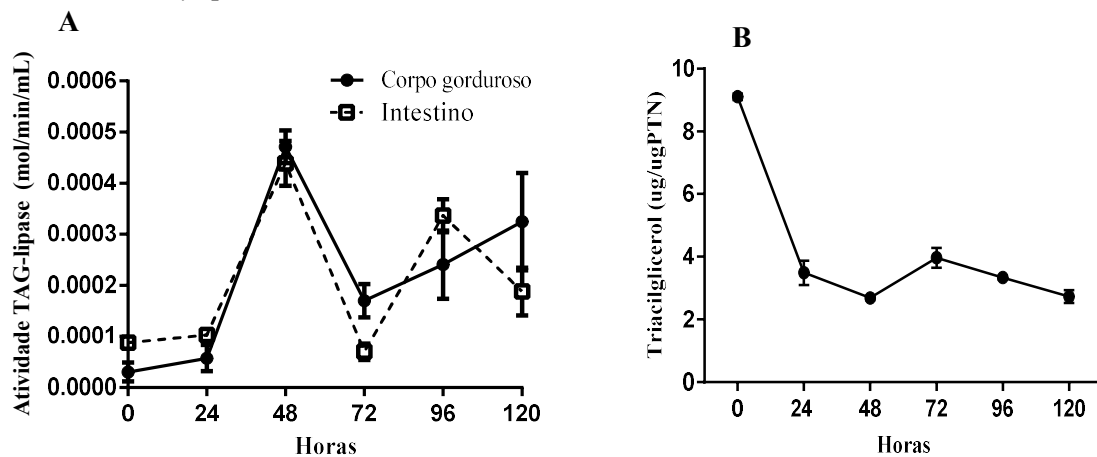
Fonte: Os autores, 2020.

Tais alterações induzidas pela dieta *high fat*, como aumento do peso, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia foram normalizadas após a suplementação com fenofibrato, fármaco amplamente utilizado em casos de hipertrigliceridemia. O principal mecanismo de ação do fenofibrato é a estimulação da lipólise, tal efeito foi analisado diariamente, a fim de observar quando o pico máximo de ação ocorre. Para isso, quantificou-se

a atividade da TAG-lipase intestinal e do corpo gorduroso, observando que apresentam respostas temporais semelhantes e têm ação máxima em 48 horas após o início da suplementação (Figura 18A), com redução máxima do conteúdo de triacilglicerol armazenado nesse período (Figura 18B). Portanto, ao conhecer que o pico de ação do fenofibrato na lipólise foi evidenciado em 48 horas, as análises a seguir começaram a ser realizadas nesse intervalo de tempo.

Tais resultados corroboram com o aumento significativo do triacilglicerol quantificado no corpo gorduroso das larvas tratadas. De igual forma, também comprova-se o efeito do fármaco em restaurar as gotículas lipídicas à situação próxima ao observado no grupo controle.

Figura 18 - Atividade da TAG-lipase do corpo gorduroso e intestino das larvas mantidas por 120 horas em uma dieta suplementada com fenofibrato a 1%, com ação máxima em 48 horas (A), quando há uma maior redução no conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso dessas larvas (B). As barras representam a média \pm desvio padrão da média de 3 determinações. *:Significativamente diferente por ANOVA *one way*, $p < 0,05$



Fonte: Os autores, 2020.

Dieta *high fat* provoca hiperinsulinemia em *T. castaneum*

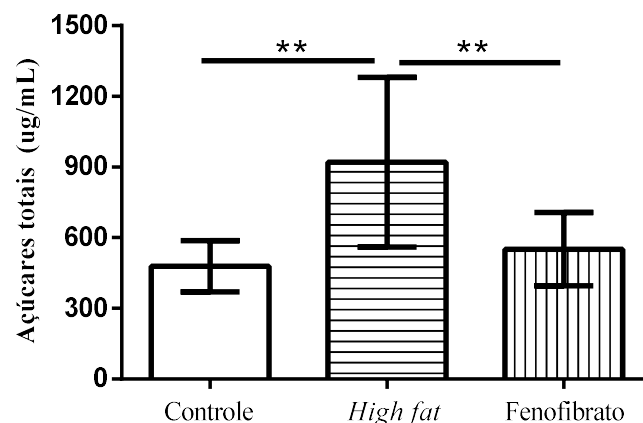
A mudança na alimentação das larvas, com oferta de lipídios, provocou significativo aumento dos triacilgliceróis armazenados no corpo gorduroso, como reserva energética, refletindo assim em expressivo aumento do peso corporal. Tais fatores já foram descritos como estando diretamente relacionados ao aumento da Resistência à Insulina (RI). Desta forma, buscou-se analisar se a dieta *high fat* também provoca alterações no metabolismo glicídico de *T. castaneum*.

Inicialmente, quantificou-se os açúcares totais de larvas inteiras (Figura 19) após 168 horas de manutenção em dieta *high fat*, onde observou-se o aumento significativo da concentração de carboidratos, quando comparado ao grupo controle (controle: $492,0 \pm 107,3$ x

high fat: $920,3 \pm 360,1$). A suplementação com fenofibrato também foi capaz de diminuir a hiperglicemia observada ($550,8 \pm 155,5$).

Assim, diante do aumento dos níveis de açúcares totais e considerando a intrínseca relação entre níveis elevados de triglicérides e sobrepeso para o desenvolvimento da Resistência à Insulina, jugou-se necessário aprofundar a análise sobre as vias regulatórias do metabolismo glicídico que atuam de forma coordenada na regulação da homeostase lipídica. Esta necessidade se baseia no fato de que uma dieta rica em gordura proporciona o aumento de lipídios intracelular, sendo um importante fator na manifestação da RI em ratos (ELLIS et al., 2000), indicando a possibilidade da reprodução deste mecanismo em outras espécies.

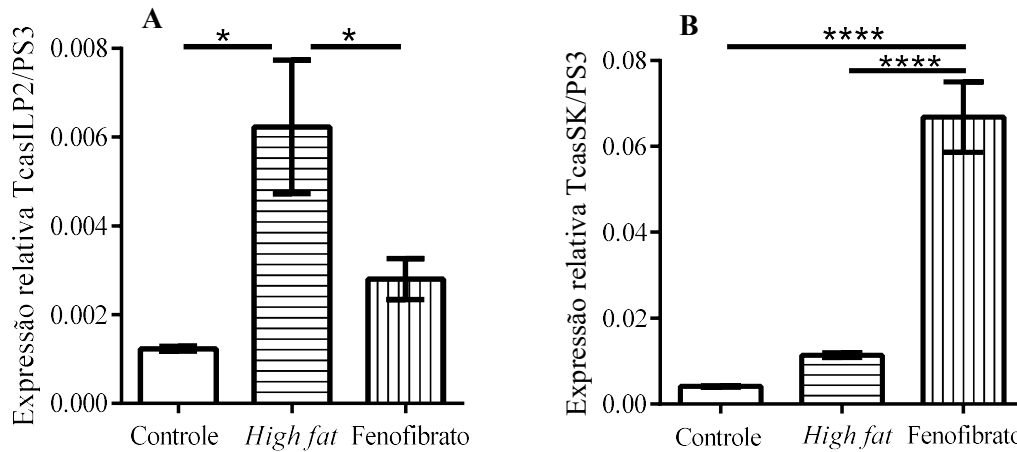
Figura 19 – Quantificação de açúcares totais de larvas inteiras expostas à dieta *high fat* por 168 horas e então transferidas para fenofibrato por 48 horas, comparada ao grupo controle. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente por ANOVA *one way*, $p < 0,05$.



Fonte: Os autores, 2020.

A regulação do metabolismo de carboidratos e lipídeos em mamíferos é exercido em parte pela insulina. Em insetos, esta regulação está relacionada a mecanismos de sinalização intracelular e de detecção de nutrientes pelas células neuro-secretoras do cérebro nos quais o gene *TcasILP2* (Peptídeo Semelhante à Insulina 2 em *T. castaneum*) é produzido (HASELTON; FRIDELL, 2010). Já a Sulfaquinina (SK) é responsável por inibir a alimentação através de sinais que induzem à saciedade, também expresso no cérebro (YU, NACHMAN, SMAGGHE; 2013). Assim, analisou-se a expressão do *TcasILP* e *TcasSK* (Figura 20) como forma de avaliar se a dieta *high fat* alterou também a expressão desses genes intrinsecamente relacionados à manutenção do metabolismo.

Figura 20 – Expressão relativa dos genes (A) *TcasILP* e (B) *TcasSK* da cabeça de larvas mantidas em dieta *high fat* por 168 horas e então transferidas para fenofibrato por 48 horas, comparadas ao grupo controle. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente por ANOVA *one way*, $p < 0,05$.



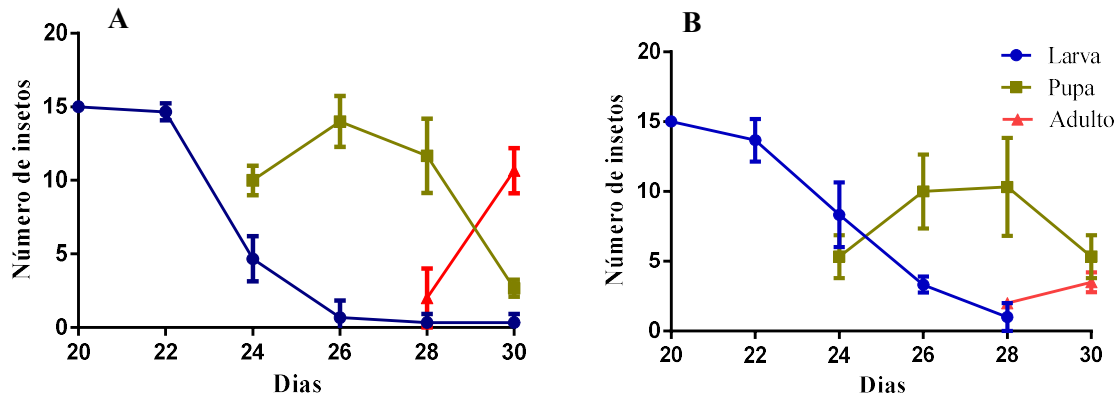
Fonte: Os autores, 2020.

Verificou-se que, após exposição à dieta *high fat* por 168 horas, houve um aumento significativo na expressão de *TcasILP* (controle: $1,2 \times 10^3 \pm 9,5 \times 10^5$ x *high fat*: $6,2 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^3$) e após suplementação com fenofibrato, essa expressão relativa reduziu ($2,8 \times 10^3 \pm 7,9 \times 10^4$) a níveis próximos aos observados no controle. Quanto à expressão de *TcasSK*, verificou-se que os níveis de expressão relativa não foram significativamente diferentes com o fornecimento de uma dieta *high fat* (controle: $4,1 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^4$ x *high fat*: $1,1 \times 10^2 \pm 5,7 \times 10^4$), mas, quando transferidas para a dieta de fenofibrato, as larvas apresentaram um aumento significativo na expressão relativa deste peptídeo ($6,6 \times 10^2 \pm 8,2 \times 10^3$).

Estas alterações podem ser consideradas um caso típico de SM, em que o maior suprimento calórico proporcionado pela dieta hiperlipídica não foi balanceado por mecanismos reguladores. Assim, o aumento circulante de macronutrientes, como açúcares (principalmente trealose), triglicerídeos e colesterol, pode levar o organismo a uma condição de estresse metabólico, devido à lipotoxicidade.

Já constatou-se, através da curva de sobrevivência de *Kaplan Meier* (Figura 13), que a dieta suplementada com óleo de oliva a 15% não altera a sobrevivência das larvas de *T. castaneum*, apesar de a SM aumentar em duas vezes o risco de morte em humanos (VIDIGAL et al, 2013). Porém, ao analisar o desenvolvimento deste inseto ao ser mantido na dieta *high fat* por 10 dias, constata-se que o processo de metamorfose sofre alteração, observado pelo menor número de adultos formados no grupo tratado quando comparado ao grupo controle (Figura 21).

Figura 21 – Alteração do processo de metamorfose das larvas mantidas em dieta *high fat* (A) quando comparadas ao grupo controle (B), com diminuição do número final de insetos na forma de pupas e adultos. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações.



Fonte: Os autores, 2020.

Desta forma, constata-se a capacidade do método aqui proposto em conduzir larvas de *T. castaneum* à condição análoga à SM, assim como a análise dos efeitos do fármaco estimulante da lipólise, o fenofibrato, em restaurar tais condições à normalidade. Assim, este modelo invertebrado apresenta alta eficácia nos estudos dos efeitos macro e microscópicos desta desordem metabólica, além de favorecer pesquisas farmacológicas de novos alvos terapêuticos.

5.8 Vantagens da Patente:

Diante do drástico aumento das doenças crônicas não transmissíveis, em especial a SM, é necessário que se avance em pesquisas que possibilitem analisar alterações histológicas, funcionais, bioquímicas e morfológicas desta disfunção em animais, que possam ser reproduzíveis em seres humanos, assim como o estudo de novos fármacos candidatos em seu tratamento. Os principais modelos utilizados são os vertebrados, em especial o murino (ratos e camundongos), porém, os relevantes aspectos éticos e elevados custos, torna emergente a necessidade de modelos alternativos. Nesse contexto, destacam-se os insetos e, especificamente, o *T. castaneum*, modelo emergente em estudos metabólicos, genéticos, bioquímicos e outros. Assim, a invenção aqui apresentada demonstra algumas vantagens, das quais é possível destacar:

✓ O modelo proposto apresenta características como ciclo de vida curto, rápida reprodução e prole numerosa, baixo custo de manutenção, genoma acessível, aspectos éticos aceitáveis e processos metabólicos análogos aos de mamíferos, proporcionando resultados que podem ser facilmente mimetizados em seres humanos;

- ✓ O método, além de propiciar estudo das desordens metabólicas, também proporciona análise dos efeitos de fármacos candidatos na geração atual e em gerações futuras, possibilitando uma compreensão transgeracional;
- ✓ A facilidade na incorporação de compostos à dieta do inseto *T. castaneum*, torna-o modelo de baixo custo e alta eficácia em distúrbios metabólicos, tais como hiperlipidemia, hipertrigliceridemia, hiperglicemia e obesidade, assim como para *screening* de fármacos, facilitando as pesquisas pré-clínicas por interferir em aspectos éticos e econômicos;
- ✓ A invenção proposta é aplicável na área de biotecnologia, na obtenção de novos fármacos e no conhecimento da fisiopatologia da SM, evidenciando como um novo método de preparo de insetos *T. castaneum* em substituição aos modelos vertebrados, comumente utilizados, podem interferir de forma positiva em pesquisas pré-clínicas, sendo portanto, um modelo de baixo custo e alta eficácia;
- ✓ A implementação deste novo método proporciona resultados mais rápidos, baratos, confiáveis, reproduzíveis, com aplicação diversificada e que promove maior diferenciação e fortalecimento da biotecnologia brasileira, já que emprega um inseto praga como modelo experimental, de maneira sustentável e eficaz.

5.9 Resumo:

Diante do drástico aumento das doenças crônicas não transmissíveis, em especial a Síndrome Metabólica, é necessário que se avance em pesquisas que possibilitem analisar alterações histológicas, funcionais, bioquímicas e morfológicas desta disfunção em animais, que possam ser reproduzíveis em seres humanos, assim como o estudo de novos fármacos candidatos em seu tratamento. Os principais modelos utilizados são os vertebrados, em especial o murino (ratos e camundongos), porém, os relevantes aspectos éticos e elevados custos, torna emergente a necessidade de modelos alternativos. Nesse contexto, destacam-se os insetos e, especificamente, o *Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae), modelo em destaque nos estudos metabólicos, genéticos, bioquímicos e outros. Assim, a presente invenção remete à aquisição de um novo método de preparação de insetos *T. castaneum*, como modelo de baixo custo e alta eficácia, para estudo da SM e do efeito de fármacos candidatos nesta disfunção. Para isto, a metodologia propõe um método para induzir insetos à condição análoga à SM e a suplementação com fármacos, a fim de se analisar seus efeitos. Tais alterações podem ser avaliadas por meios das técnicas investigativas descritas, como bioquímicas e de biologia molecular. A implementação deste novo método proporciona resultados mais rápidos, baratos, confiáveis, reproduzíveis, com aplicação diversificada e que promove maior diferenciação e

fortalecimento da biotecnologia brasileira, já que emprega um inseto praga como modelo experimental, de maneira sustentável e eficaz.

5.10 Reivindicações:

1. O método de preparação de um modelo invertebrado para estudo da SM em insetos *T. castaneum* é caracterizado por: dieta com alto teor de lipídios, oferecida de forma contínua por um período de 168 horas, descrita na seguinte proporção: para 3 g de farinha de trigo, a dieta base, 15 % de adição de gordura monoinsaturada.

2. Método de preparação, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a gordura monoinsaturada descrita é o azeite de oliva, com 2.4 g de farinha de trigo e 600 µL de azeite de oliva, homogeneizados por maceração.

3. Os objetivos do modelo invertebrado descrito na reivindicação 1 e 2 é o estudo dos efeitos da SM neste modelo e a triagem de medicamentos para esta disfunção.

4. Um tipo de medicamento é rastreado como método para o tratamento da SM e é caracterizado por compreender as etapas:

A, de acordo com os métodos descritos nas reivindicações 1 ou 2, configura-se a SM em insetos *T. castaneum*;

B, candidato a medicamento é oferecido ao modelo invertebrado por maceração junto à dieta base;

C, avaliação do potencial do medicamento no tratamento da SM em modelo invertebrado.

5.11 Palavras Chave:

Tribolium castaneum; modelo experimental; Síndrome Metabólica; fármacos.

Tribolium castaneum; experimental model; Metabolic Syndrome; drugs.

5.12 Fontes De Financiamento:

Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas – FAPEAL

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

5.13 Inventores:

Meirielly Kellya Holanda da Silva;

Larissa Costa;

Mariana de Macêdo Costa Batalha;

Luana;

Josiel Santos do Nascimento;
Viviane Dalbon;
Antônio Thomás da Silva;

Thays Fontes
Camila Braga Dornelas;
Luciano Aparecido Meireles Grillo

6 A bioenergética mitocondrial é comprometida pela inflexibilidade metabólica induzida por dieta *high fat* em larvas de *Tribolium castaneum*

A bioenergética mitocondrial é comprometida pela inflexibilidade metabólica induzida por dieta *high fat* em larvas de *Tribolium castaneum*

¹ SILVA, Meirielly Kellya Holanda

² SILVA-FILHO, Reginaldo Correia

³ BATALHA, Mariana de Macêdo Costa

⁴ LEITE, Ana Catarina Rezende

⁵ DORNELAS, Camila Braga

⁶ GRILLO, Luciano Aparecido Meireles

A Síndrome Metabólica, caracterizada clinicamente por hiperglicemia, hipertensão, altos níveis de triglicérides, diminuição dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL-c) e obesidade, tem origem multifatorial, embora estudos tenham atribuído sua gênese à distúrbios mitocondriais. Sendo assim, este estudo teve como objetivo analisar os parâmetros bioenergéticos mitocondriais e as alterações bioquímicas e metabólicas no corpo gorduroso. Para isso, as larvas do inseto *Tribolium castaneum* foram mantidas em dieta rica em gordura por 168 horas e, posteriormente, transferidas para uma dieta suplementada com fenofibrato a 1% por 48 ou 120 horas, sendo analisados parâmetros como peso, colesterol total, açúcares totais, triacilglicerol, expressão dos genes Sulfaquinina e Peptídeo Semelhante à Insulina, além da respiração mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio. Identificou-se que a suplementação com azeite a 15% produziu situação de inflexibilidade metabólica, induzindo à hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e obesidade, alterações observadas na Síndrome Metabólica, além de hiperinsulinemia. Nesse grupo, também observou-se maior geração de espécies reativas de oxigênio, com conseqüente aumento da respiração mitocondrial (utilizando substrato para o complexo II/SDH), provavelmente como mecanismo compensatório. Por outro lado, a suplementação com fenofibrato restaurou as disfunções metabólicas para um nível próximo ao observado no grupo controle, através de mecanismos diretos (ação na regulação mitocondrial) ou indiretos (redução das disfunções pela estimulação da lipólise). Tais resultados comprovam o uso do *Tribolium castaneum* como modelo alternativo de baixo custo e alta eficiência para estudos do metabolismo lipídico e bioenergética mitocondrial.

Palavras-chave: *Tribolium castaneum*. Bioenergética mitochondrial. Corpo gorduroso. Síndrome metabólica. Flexibilidade metabólica.

6.1 Introdução

Tendo em vista o sucesso no controle de várias doenças transmissíveis em todo o mundo, os interesses se voltaram para as doenças não transmissíveis (DNTs), considerando as altas taxas de mortalidade e morbidade nos países em desenvolvimento. No contexto das DCNT, destaca-se a Síndrome Metabólica (SM), considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento da obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), acidente vascular cerebral, doença coronariana, aterosclerose, entre outros (SAKLAYEN, 2018), sendo caracterizada por hiperglicemia, hipertensão, altos níveis de triglicérides, diminuição dos valores de colesterol de alta densidade (HDL-c) e obesidade (VIDIGAL et al., 2013).

Embora exista uma correlação entre a Síndrome Metabólica e a herança genética (LOCKE et al., 2015), as pesquisas apontam para uma relação mais íntima entre esse distúrbio e a (in)flexibilidade metabólica, ou seja, a (in)adaptação eficiente do metabolismo de acordo com a oferta e demanda de nutrientes (OLSON; SCHELL; RUTTER, 2016). Assim, a inflexibilidade ou plasticidade metabólica está relacionada às vias metabólicas que regulam a detecção, absorção, transporte, armazenamento e uso de nutrientes através sua síntese, degradação ou regulação da atividade de proteínas ou enzimas (SMITH et al., 2018). Nesta regulação, destaca-se o papel das mitocôndrias, considerando sua importância fundamental na transformação de intermediários do metabolismo e sabendo que o estresse oxidativo e as disfunções mitocondriais, principalmente relacionadas ao complexo II (SVERDLOV et al., 2015; NGO et al., 2019), podendo estar associados à resistência à insulina, obesidade e DM2 (AUCOUTURIER; DUCHÉ; TIMMONS, 2011), alterações encontradas na Síndrome Metabólica.

As disfunções mitocondriais, com conseqüente aumento da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), estão fortemente relacionadas às alterações na Síndrome Metabólica, isso ocorre devido à alta ingestão calórica e o baixo gasto energético, que pode causar um aumento no gradiente de prótons e uma menor demanda de ATP, assim, o excesso de elétrons é transferido para o O₂ sem a conseqüente produção de ATP (GREEN; GALLUZZI; KROEMER, 2011), gerando espécies reativas de oxigênio.

Além da geração de EROs, a oxidação lipídica descontrolada, também conhecida como peroxidação lipídica, é um importante processo biológico que resulta em espécies lipídicas oxidadas, contribuindo para a gênese da Síndrome Metabólica (KETONEN; TARU; EERO, 2010). Muito se avançou no conhecimento das intrincadas vias regulatórias dessa síndrome, no

entanto, uma questão emergente é a substituição de modelos de vertebrados devido a questões éticas relevantes e altos custos de manutenção, por modelos de invertebrados, como insetos (INSUA et al. , 2013).

É nesse contexto que o *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecido como besouro vermelho da farinha, uma das principais pragas de grãos armazenados, é proposto como modelo experimental, tendo em vista sua rápida reprodução, alta fertilidade, intervalos de curta geração , baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis, genoma acessível em banco de dados, além das seqüências genéticas com intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo seres humanos, compartilhando com eles cerca de 126 grupos de genes ortólogos (RICHARDS et al., 2008; FARONI; FRABETTI, 2009). O uso desse inseto para estudos metabólicos é bastante viável, uma vez que o processo digestivo e o metabolismo lipídico dos insetos ocorrem de maneira semelhante à dos mamíferos (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007; GRILLO; PONTES; GONDIM, 2003).

Além disso, *T. castaneum* também é um modelo adequado para estudar o efeito de medicamentos como o fenofibrato, um estimulante da lipólise amplamente utilizado no tratamento da hipertrigliceridemia. Embora os insetos não possuam PPAR- α , o principal receptor nuclear envolvido no mecanismo de ação desse fibrato em mamíferos, ressalta-se que ele atua independentemente desse receptor (WILK et al., 2015). Assim, a escolha do fenofibrato neste estudo deve-se à sua provável relação com o metabolismo mitocondrial, sendo, portanto, um ponto importante a ser investigado.

Assim, ao induzir larvas de *T. castaneum* a uma condição de inflexibilidade metabólica, causada pelo suprimento de uma dieta rica em gorduras, o objetivo foi analisar a bioenergética mitocondrial, por meio de parâmetros respiratórios e produção de ERO e as alterações bioquímicas e metabólicas causadas de maneira semelhante, observou-se se após a suplementação com um estimulante da lipólise, o fenofibrato, essas disfunções seriam normalizadas, com base no princípio de que esta droga atua sobre a respiração mitocondrial. Essas organelas serão estudadas quanto à sua função promotora ou protetora em distúrbios, como a Síndrome Metabólica.

6.2 Materiais e Métodos

Insetos

Os insetos *Tribolium castaneum* utilizados nesta pesquisa pertencem à colônia mantida no Laboratório de Bioquímica Metabólica - LBM, da Universidade Federal de Alagoas

(UFAL). Os insetos foram mantidos em dieta base (farinha de trigo) à 30°C, entre 70 e 80% de umidade relativa e fotoperíodo claro/escuro. Utilizou-se larvas sincronizadas com aproximadamente 15 dias (L-15) após ovogênese.

Dietas Suplementadas

Dieta *high fat*

Como forma de induzir as larvas a uma condição semelhante à Síndrome Metabólica, uma dieta rica em gordura foi inicialmente padronizada (SILVA et al., 2020), incorporando azeite (15%) na dieta base por maceração, mantendo grupos de 20 larvas nesta dieta suplementada por 168 horas.

Dieta suplementada com fenofibrato

O estimulante da lipólise (fenofibrato 200 mg) foi adicionado à dieta base por maceração, obtendo-se uma concentração final de 0,01 g de fenofibrato/1 g de farinha. Após manter as larvas por 168 horas na dieta hiperlipídica, elas foram transferidas para uma dieta suplementada com fenofibrato 1% ou de volta a uma dieta base por 120 ou 48 horas. A manutenção das larvas nas dietas suplementadas foi realizada em triplicata, comparando os resultados obtidos com o grupo controle.

Peso corporal e Índices Nutricionais

As larvas, por grupo de análise, foram pesadas em uma balança de alta precisão (Shimadzu AUY-220, UniBloc) antes de serem expostas às dietas suplementadas e após o período determinado para cada dieta. Também pesou-se as microplacas com as dietas antes da inserção das larvas e após o período determinado. Os índices nutricionais foram calculados a partir das fórmulas de Taxa de Crescimento Relativo (TGR), Taxa de Consumo Relativa (TCR) e Eficiência de Conversão de Alimentos Ingeridos (ECI) (XIE et al., 1996), considerando o seguinte: $TCR = \text{mg de biomassa adquirida}/(\text{mg de biomassa inicial do inseto} \times \text{dia})$; $TGR = \text{mg de biomassa ingerida}/(\text{mg de biomassa inicial do inseto} \times \text{dia})$; $ECI (\%) = (\text{biomassa adquirida}/\text{alimento ingerido}) \times 100$.

Extração de hemolinfa e quantificação do colesterol total

Uma quantidade igual de 45 larvas por grupo foi lavada e seca e, em seguida, um pequeno orifício foi feito abaixo do segundo segmento dorsal em cada inseto, usando uma agulha. Cinco larvas de cada vez foram acomodadas em um endorfe de 200 µl modificado (com 5 pequenos orifícios na base) para permitir a drenagem da hemolinfa. Em seguida, o

ependorfe modificado foi acomodado em um segundo ependorfe de 500 μ l, para que a hemolinfa pudesse ser adequadamente coletada. Após este procedimento, foi realizada centrifugação de 3.000 rpm por 15 segundos em temperatura ambiente. O volume total coletado foi homogeneizado em 100 μ l de solução salina a 0,9% mantido sob refrigeração, sendo então centrifugado por 15 minutos a 3.000 rpm para separar o precipitado, que foi descartado, sendo o sobrenadante usado nas dosagens seguintes. Após quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) e normalização para 20 μ g de proteínas, as amostras foram analisadas pelo kit comercial Bioclin, utilizando o reagente específico para colesterol número 2, montado na placa de 96 poços, que foi incubada por 10 minutos a 37 °C, para análises posteriores com comprimento de onda de 500 nm em uma leitora Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA). Os valores de absorvância obtidos foram convertidos para concentração usando uma curva padrão para o colesterol total. Todas as dosagens foram realizadas em triplicado e o branco foi feito com reagente na ausência de uma amostra. Os valores de colesterol foram expressos no gráfico como μ g de colesterol/ μ g de proteína.

Quantificação de açúcares totais

A quantificação dos açúcares totais foi determinada pelo método fenolsulfúrico (DUBOIS et al., 1956). 20 larvas por grupo foram lavadas e secas, maceradas em 300 μ l de ácido perclórico e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um ependorfe. Foram utilizados 10 μ L deste sobrenadante para preparar a solução, adicionando 190 μ L de ácido perclórico. 30 μ l desta solução, 30 μ l de fenol a 5%, 140 μ l de ácido sulfúrico foram adicionados a cada poço, em uma placa de 96 poços, em triplicata. A placa foi incubada por 10 minutos a 37 °C, para posterior análise em uma leitora Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 490 nm. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos para a concentração através de uma curva de calibração obtida usando a glicose como padrão.

Quantificação de triacilglicerol

O corpo gorduroso de aproximadamente 10 larvas de cada grupo de análise foi macerado em 400 μ L de solução salina a 0,9% e o homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. Depois disso, o sobrenadante foi removido e armazenado como amostra. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e o volume correspondente a 20 μ g de proteína de cada extrato foi utilizado para medir o triacilglicerol (TAG) por meio do kit comercial Bioclin, utilizando as amostras obtidas e o reagente específico,

montado na placa de 96 poços, que foi incubada por 10 minutos a 37 °C, para posterior análise em uma leitora Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de 500 nm. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em concentração usando uma curva padrão para triacilglicerol. Todas as dosagens foram realizadas em triplicatas e o branco foi feito com reagente na ausência de uma amostra. Os valores da concentração de TAG foram expressos no gráfico como μg de TAG/ μg de proteína.

Análise da atividade da enzima TAG-lipase

A atividade da enzima TAG-lipase foi verificada de acordo com Choi, Hwang e Kim (2003) no corpo gorduroso e intestino das larvas do grupo controle e exposto às dietas suplementadas. Para isso, 200 μl do substrato (tecido homogeneizado em solução salina a 0,9%) foram adicionados à mistura de reação padrão (20 μL de DMPTB 10 mM, 20 μL de DTNB 40 mM, 2 μl de EDTA 0,5 M, 5 μl de EDTA 0,5 M, 5 μl de Triton X-100 10% e 50 μL de Tris-Cl 1 M, pH 7,5, completado com 803 μl de água desionizada para produzir um volume final de 900 μl). A lipase de *Candida rugosa* (Sigma L1754, 724 U/mg de proteína, ST. Louis, EUA) foi dissolvida com tampão L (KCl 10 mM, Tris-Cl 10 mM, pH 7,5). Os poços da microplaca foram preenchidos com 10 μg da enzima e completados com 200 μl desta mistura com substrato. Para a detecção específica da atividade da lipase em extratos de tecido bruto foi utilizado um branco que não continha DMPTB. A microplaca foi transferida imediatamente para uma incubadora à 37°C para iniciar a reação. Após o período de incubação de 30 minutos, a absorbância de cada poço foi medida a 405 nm usando uma leitora de microplacas Flex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA). Os resultados dessa atividade enzimática foram calculados a partir das absorbâncias obtidas pela equação: $\{[(\text{teste de absorbância} - \text{absorbância branca}) * 200]/\text{tempo de incubação (min)}/\text{coeficiente de extinção molar (13,6M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$. Os resultados foram apresentados nos gráficos como Unidades/mol/min/mL.

Coloração das gotículas lipídicas com Vermelho do Nilo

Os corpos gordurosos das larvas por grupo de análise foram corados com Vermelho do Nilo conforme descrito anteriormente (Defferrari; Orchard; Lange, 2016) para a análise das gotículas lipídicas. Os corpos gordurosos foram incubados por 15 minutos em Vermelho do Nilo a 0,001 % (Sigma-Aldrich) e DAPI de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich) em glicerol a 75 %. Os tecidos foram montados em glicerol a 100 % e imediatamente fotografados em um microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE, em dois experimentos independentes. Os comprimentos de onda de excitação utilizados foram 543 nm para o Nilo Vermelho e 280 nm

para DAPI. As pilhas Z foram obtidas de 20 a 25 seções ópticas (1,5 µm cada) usando uma objetiva 20 ×, e as regiões periféricas dos corpos gordurosos foram analisadas. Os diâmetros médios das gotículas lipídicas foram obtidos a partir de uma imagem representativa de cada grupo de insetos, utilizando o software de análise de imagens DAIME após segmentação automática da detecção de bordas.

Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A expressão dos genes da Sulfaquinina (SK) e do Peptídeo Semelhante à Insulina 2 (ILP2) foi analisada usando RT-qPCR, comparando os valores com o gene da proteína ribossômica endógena S3 (PS3). Para análise de ambos os genes, o RNA foi extraído da cabeça de 10 larvas por grupo, utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA). O RNA total extraído foi quantificado em um espectrofotômetro L-quant (Loccus, Cotia, BRA) e avaliado quanto à pureza através da análise da razão entre a absorvância observada nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. As amostras foram consideradas adequadas para uso quando a razão 260/280 foi maior que 1,8 e menor que 2 (LEHNINGER et al., 2004). As amostras foram tratadas com DNase I livre de RNase e, em seguida, realizou-se a síntese de cDNA. O RT-qPCR foi realizado usando iniciadores específicos para os genes alvo (Tabela Suplementar 1S) em um termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), usando o kit Power SYBR® Green PCR (Applied Biosystems). O programa de variação de temperatura utilizado foi: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 45 segundos, seguido pela curva de fusão.

Análise da Bioenergética Mitocondrial

Permeabilização dos corpos gordurosos

Para permeabilização química e mecânica, os corpos gordurosos de 15 larvas (L-15) por grupo (aproximadamente 11,5 g) foram extraídos manualmente, sendo mantidos sob agitação magnética (aproximadamente 100 rpm) em gelo por 20 minutos, em 6 ml de BIOPS (EGTA 10 mM; Imidazol 20 mM; Taurina 20 mM; MOPS 50 mM; MgCl₂ 6.56 mM; Saponina 0.05 mg/mL; pH 7.1). Após este período, o sobrenadante foi removido e o precipitado foi a amostra a ser utilizada. Todos os testes foram realizados em um meio de reação padrão composto por Ca-EGTA 0,5 mM; MgCl₂ 3 mM; MOPS 60 mM; Taurina 20 mM; KH₂PO₄ 10 mM; HEPES 20 mM; Sacarose 110 mM; BSA a 4%; pH 7,2 a 37°C.

Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio mitocondrial dos corpos gordurosos permeabilizados foi medido utilizando um eletrodo OXIGY Oxygraph (Hansateh Instrument, EUA), em uma câmara de vidro de 1,0 mL equipada com um agitador magnético e termostatizado (37°C), usando substrato para o segundo complexo da cadeia transportadora de elétrons, Succinato, incubada em um meio de reação (Rotenona 0,2 μ M - inibidor do complexo I e Succinato 10 mM - substrato para o complexo II), além de ADP (250 μ M), Oligomicina (1 μ g/mL) e CCCP (3 μ M), todos os compostos foram adicionados sequencialmente.

Produção de espécies reativas de oxigênio

A geração de EROs foi monitorada espectrofluorimetricamente (Shimatsu RF5300). Após permeabilização química e mecânica, 15 corpos gordurosos foram transferidos para o fluorímetro em meio de reação padrão contendo Succinato 5 mM, ADP 250 μ M e a sonda H₂-DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína) em um volume final de 1 mL. O H₂-DCFDA - 1mM (LEBEL et al., 1992) teve sua fluorescência monitorada no comprimento de onda de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, com uma largura de ranhura de 5 nm.

Análise estatística

Os valores de $\Delta\Delta C_t$ e a quantidade relativa da expressão gênica foram calculados a partir dos valores de C_t ("ciclo limite", que é o número de ciclos necessários para produzir uma quantidade definida de fluorescência), obtidos por PCR em tempo real (NORGARD et al., 2006). Esses valores foram utilizados para análise estatística específica de cada experimento, conforme indicado nas legendas das figuras. Os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) foram utilizados apenas para montar os gráficos. Os dados foram catalogados e analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism[®] e Origin8[®]. As diferenças estatísticas entre os dados paramétricos e não paramétricos foram determinadas pela análise de variância ANOVA *one-way* ou *two-way*, assumindo significância quando $p < 0,05$.

6.3 Resultados e Discussão

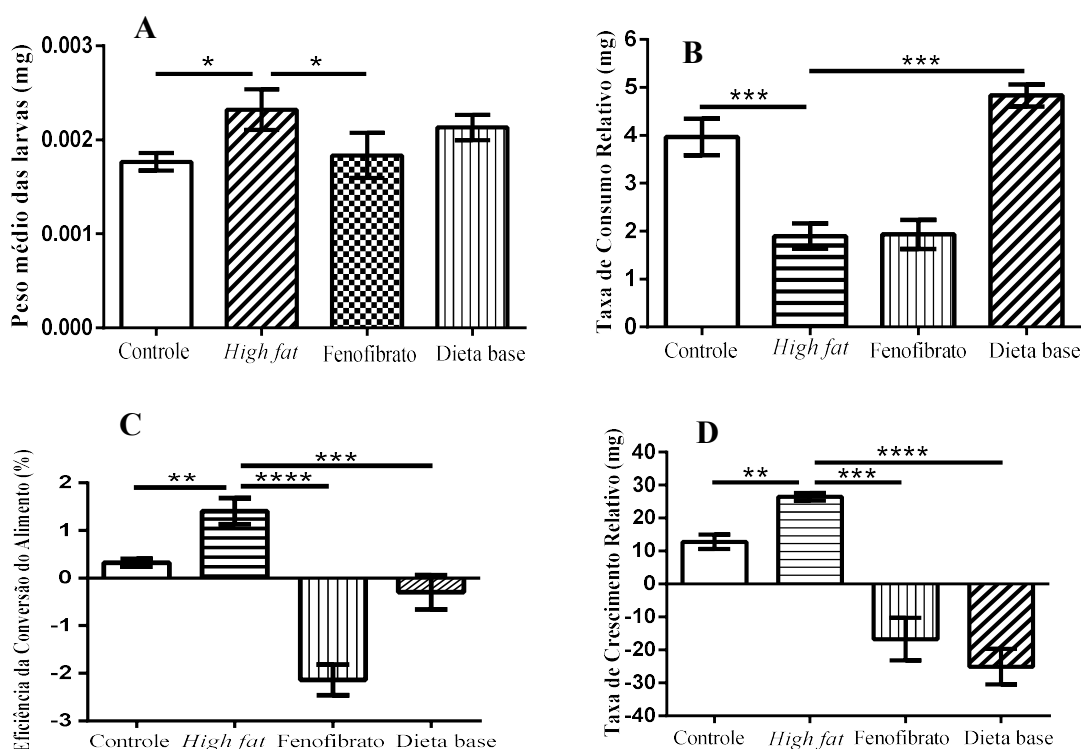
Dieta *high fat* induz larvas de *T. castaneum* a condição análoga à Síndrome Metabólica

As larvas mantidas por 168 horas em uma dieta suplementada com azeite a 15% apresentaram um ganho de peso 68,8% maior que as larvas do grupo controle (controle: $9,1 \times 10^2 \pm 5,8 \times 10^2$ x *high fat*: $4,6 \times 10^2 \pm 1,9 \times 10^2$). Após este tempo, as larvas foram distribuídas entre dieta suplementada com fenofibrato e retorno à dieta base, onde foi possível constatar que a manutenção por 120 horas em uma dieta base não causou uma redução significativa no peso

dessas larvas, no entanto, a adição de fenofibrato 1% alcançou uma diferença significativa (Figura 22A).

Assim, o ganho de peso das larvas expostas à dieta *high fat* justifica-se pelo alto valor lipídico e não pelo aumento da quantidade ingerida, considerando que este grupo apresentou diminuição da Taxa de Consumo Relativo - TCR (Figura 22B) (controle: $3,9 \pm 0,3$ x *high fat*: $1,9 \pm 0,2$). No entanto, o aumento significativo na Eficiência de Conversão do alimento Ingerido - ECI (Figura 22C) (controle: $0,3 \pm 0,08$ x *high fat*: $1,4 \pm 0,27$) levou a um melhor uso/absorção de alimentos, refletido no aumento considerável da Taxa de Crescimento Relativo - TGR (Figura 22D) (controle: $12,7 \pm 2,2$ x *high fat*: $26,4 \pm 1,1$), explicando o ganho de peso nas larvas deste grupo. Por outro lado, as larvas transferidas para uma dieta suplementada com fenofibrato, comparadas às larvas que retornaram à dieta base, comeram menos, com menor TCR (Figura 22B), apresentaram menor ECI (Figura 22C), o que refletiu na redução da TGR (Figura 22D), ou seja, a mudança alimentar estimulou uma condição catabólica, evidenciada mais fortemente pela ação da droga.

Figura 22 - O ganho de peso induzido por uma dieta rica em gordura é restaurado após a suplementação com fenofibrato. As larvas foram mantidas por 168 horas em uma dieta rica em gordura e depois transferidas para uma dieta base ou suplementadas com fenofibrato a 1% por 120 horas. O peso médio das larvas aumenta quando mantido em uma dieta *high fat*, em comparação com o grupo controle, e é restaurado após a suplementação com fenofibrato (A). Índices nutricionais das larvas: Taxa de Consumo Relativa (B); Eficiência da conversão de alimento ingerido (C); Taxa de Crescimento Relativo (D). As barras representam a média \pm D.P. a partir da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente pelo teste ANOVA *one-way*, $p < 0,05$.

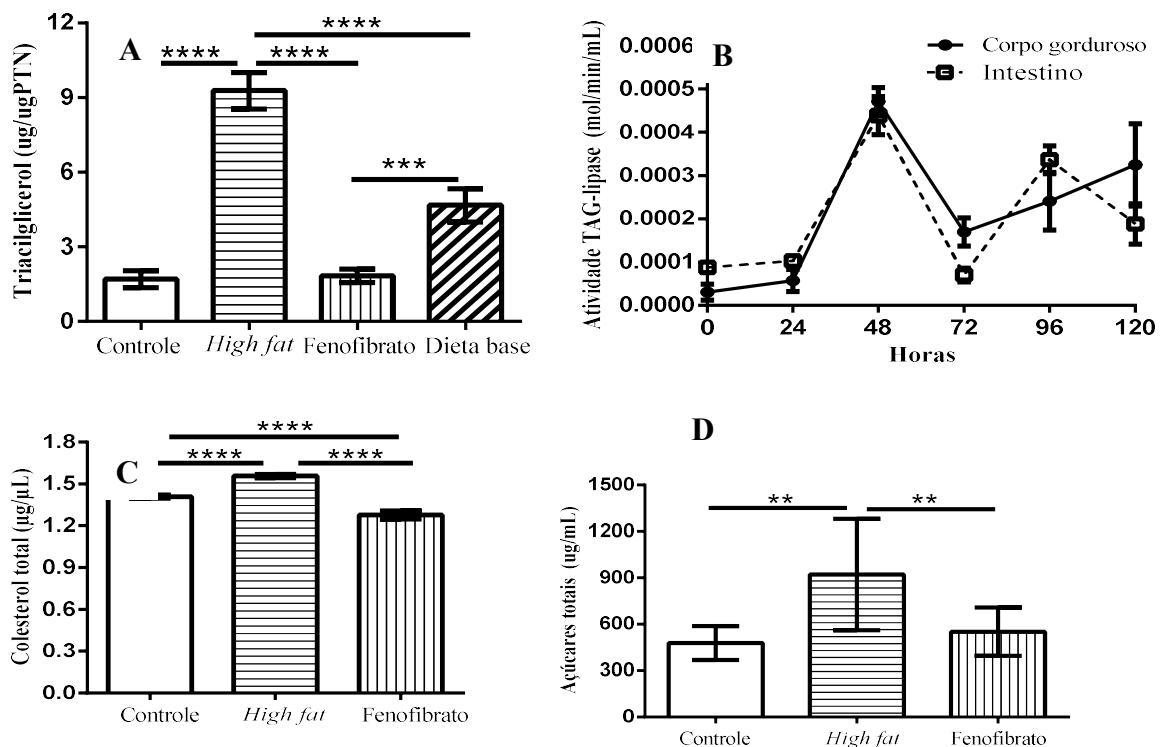


Fonte: Os autores, 2020.

A obesidade, um componente proeminente da Síndrome Metabólica, pode ser caracterizada como uma incapacidade de equilibrar os processos intrínsecos à fome (lipolítica) e aos alimentos (antilipolítica), ou seja, uma inflexibilidade metabólica. Da mesma forma, é essa inflexibilidade que determina os mecanismos de resistência à insulina (AUCOUTURIER; DUCHÉ; TIMMONS, 2011), outra alteração presente nessa síndrome.

Além da obesidade, a dieta hiperlipídica também causou um aumento de 72,8% no conteúdo de triacilglicerol dessas larvas quando comparado ao grupo controle (controle: $5,54 \pm 0,54$ x *high fat*: $9,5 \pm 0,27$), caracterizando uma condição de hipertrigliceridemia. Somente a mudança na dieta causou uma redução significativa de 51,5% na quantidade de triacilglicerol armazenado no corpo gorduroso das larvas, enquanto a adição de fenofibrato 1% causou uma diminuição de 83,1% (Figura 23A). Embora esta diminuição tenha ocorrido em ambos os casos, existe uma diferença significativa entre a dieta base e o suplemento com o medicamento, mostrando que os resultados mais significativos são devidos ao mecanismo de ação do fenofibrato e, portanto, as análises a seguir foram realizadas apenas com esta condição.

Figura 23 - Distúrbios metabólicos causados pela dieta *high hat* são reduzidos com o uso de fenofibrato. Quantificação do triacilglicerol no corpo gorduroso (A), atividade da enzima TAG-lipase no corpo gorduroso e intestino das larvas mantidas por 120 horas em uma dieta suplementada com fenofibrato a 1%, com ação máxima em 48 horas (B); colesterol total da hemolinfa (C) e açúcares totais (D) das larvas, mostrando um aumento nessas taxas após 168 horas em uma dieta *high hat* e redução quando transferidas para a suplementação com fenofibrato. As barras representam a média \pm D.P. da média de 3 determinações. (*): Significativamente diferente pelo teste ANOVA *one-way*, $p < 0,05$.



Fonte: Os autores, 2020.

O principal mecanismo de ação do fenofibrato, a estimulação da lipólise, foi analisada diariamente, a fim de observar quando ocorre o pico máximo de ação. Para isso, quantificou-se a atividade da enzima TAG-lipase intestinal e do corpo gorduroso, observando que apresentam respostas temporais semelhantes e têm ação máxima em 48 horas após o início da suplementação (Figura 23B), com redução máxima do conteúdo de triacilglicerol armazenado no corpo gorduroso nesse período (Figura Suplementar 1S). Embora não tenha se observado diferença significativa entre as duas lipases, ao iniciar a suplementação, constata-se maior atividade da TAG-lipase intestinal, responsável pela quebra e absorção lipídica, enquanto após 120 horas, há maior atividade da TAG-lipase presente no corpo gorduroso, como manutenção contínua da lipólise.

Observa-se que, as larvas transferidas da dieta *high fat* para a dieta base, apresentam melhora significativa nas condições metabólicas; no entanto, o fenofibrato leva essas condições a níveis mais próximos aos observados no grupo controle (Figura 23A), desta forma, para as análises posteriores utilizou-se apenas as larvas transferidas para dieta suplementada com o fármaco. De forma semelhante, comprovou-se que o pico de ação do fenofibrato sobre a lipólise foi evidenciado em 48 horas (Figura 23B), portanto, as análises a seguir começaram a ser realizadas nesse intervalo de tempo.

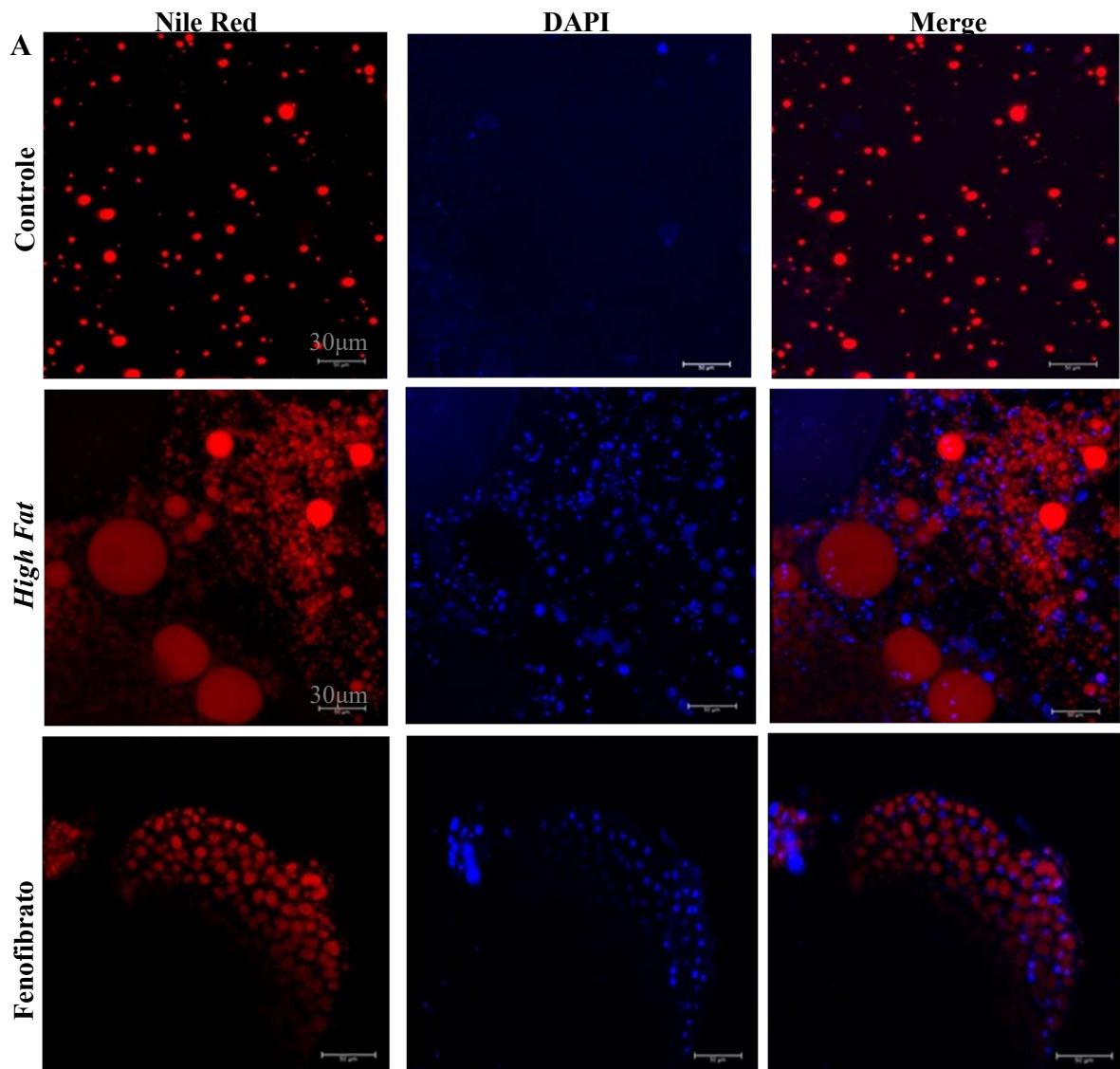
Continuamente, verificou-se que a dieta *high fat* também alterou os níveis de colesterol total (Figura 23C) presentes na hemolinfa das larvas e nos açúcares totais (Figura 23D), mas a suplementação com fenofibrato reduziu os níveis de colesterol total abaixo dos níveis observados no grupo controle (controle: $1,4 \pm 0,01$ x *high fat*: $1,5 \pm 0,01$ x fenofibrato: $1,2 \pm 0,03$) e, da mesma forma, a droga também diminuiu os níveis de açúcares totais (controle: $492 \pm 107,3$ x alto teor de gordura: $920,3 \pm 360,1$ x fenofibrato: $550,8 \pm 155,5$), restabelecendo as condições de hipercolesterolemia e hiperglicemia observadas nas larvas.

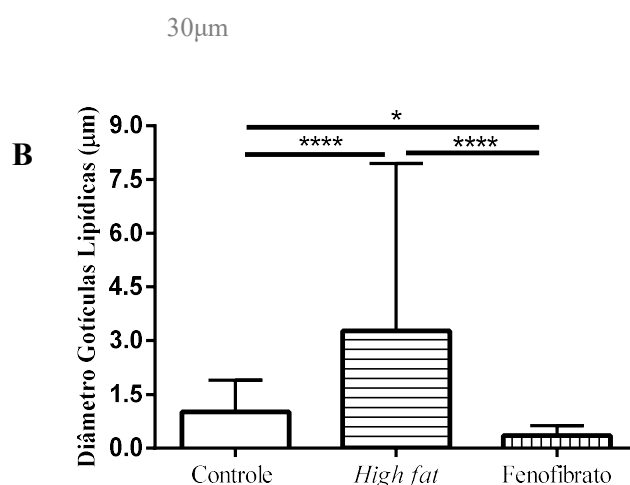
Está comprovado, portanto, que a dieta hiperlipídica causou uma situação de inflexibilidade metabólica devido o aumento do suprimento lipídico, estabelecendo uma condição semelhante à Síndrome Metabólica, com hipertrigliceridemia, obesidade, hipercolesterolemia e hiperglicemia. Tais disfunções foram normalizadas após o uso de fenofibrato, em um processo de (re)organização metabólica. Além disso, isso pode ser evidenciado pelo teste de microscopia do corpo gorduroso, realizada em um microscópio confocal e corado com vermelho do Nilo, específico para coração lipídica, e DAPI para coloração de núcleos (ALVES-BEZERRA et al., 2015) (Figura 24).

As imagens mostraram alterações na espessura e quantidade de gotículas do corpo gorduroso das larvas submetidas à dieta *high fat*, mostrando a função desse tecido em armazenar

o triacilglicerol como estoque de energia. Esse resultado corrobora com o aumento significativo do triacilglicerol quantificado no corpo adiposo das larvas tratadas. Por outro lado, o fenofibrato tem a capacidade de diminuir o volume lipídico armazenado, bem como reorganizar as gotículas lipídicas, comprovando os resultados anteriores.

Figura 24 - O triacilglicerol é acumulado nos corpos gordurosos após uma dieta rica em gorduras. Gotas de lipídios corados com Vermelho do Nilo e núcleos corados com DAPI são visualizados em seções ópticas de corpos gordurosos do grupo de larvas controle e alimentadas com dieta *high fat* por 168 dias, depois transferidas para fenofibrato 1% por 48 horas, comparadas ao grupo controle. (A) Imagens representativas de corpos gordurosos. Barras de escala = 30 μ m. (B) A média de um medidor de gotículas foi determinada na imagem mostrada no painel. As barras representam a média \pm D.P. de pelo menos 500 gotículas lipídicas. *: Significativamente diferente pelo teste ANOVA *one-way* $p < 0,05$.



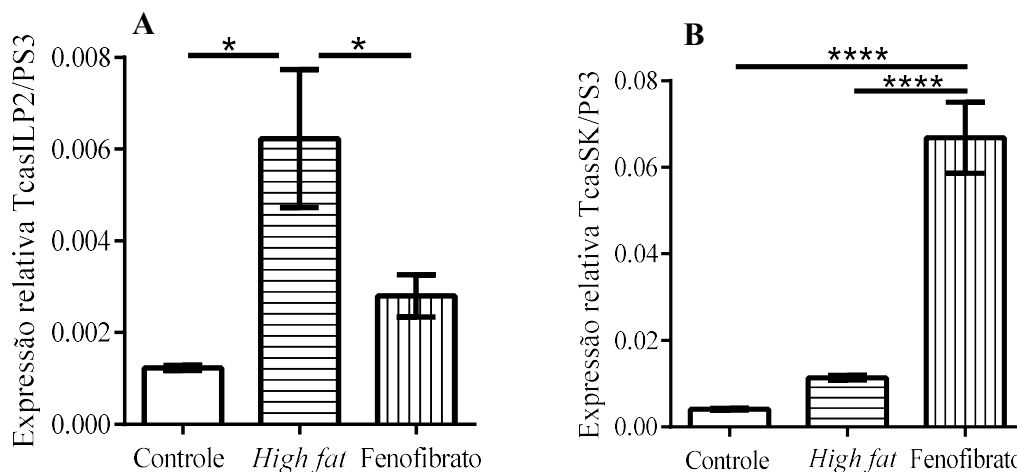


Fonte: Os autores, 2020.

Sabe-se que alguns componentes hormonais são responsáveis por manter a homeostase do triacilglicerol no corpo dos insetos (GONDIM et al., 2018; HEIER; KÜHNLEIN, 2018). O equilíbrio metabólico de carboidratos e lipídios em mamíferos é exercido em parte pela insulina. Em invertebrados, como insetos, essa regulação está associada a mecanismos de sinalização intracelular e detecção de nutrientes por células neuro secretoras localizadas no cérebro, onde é expresso o Peptídeo Semelhante à Insulina 2 em *T. castaneum* (TcasILP2) (HASELTON; FRIDELL, 2010) A Sulfaquinina (SK) é responsável por inibir a ingestão de alimentos por meio de sinais indutores de saciedade, também expressos no cérebro (YU, NACHMAN, SMAGGHE; 2013). Assim, a expressão dos genes TcasILP2 e TcasSK (Figura 25) foi analisada como uma maneira de avaliar a interconexão entre as vias reguladoras do metabolismo lipídico e alterações no perfil alimentar.

Verificou-se que a manutenção em dieta *high fat* por 168 horas provocou aumento significativo na expressão de TcasILP, e após suplementação com fenofibrato por 48 horas, essa expressão relativa diminuiu a níveis próximos aos observados no controle (controle: $1,2 \times 10^3 \pm 9,5 \times 10^5$ x *high fat*: $6,2 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^3$ x fenofibrato: $2,8 \times 10^3 \pm 7,9 \times 10^4$). Quanto à expressão de TcasSK, verificou-se que os níveis de expressão relativa não foram significativamente diferentes com a manutenção de uma dieta *high fat*, mas, quando transferidas para fenofibrato 1%, as larvas apresentaram aumento significativo na expressão relativa deste peptídeo (controle: $4,1 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^4$ x *high fat*: $1,1 \times 10^2 \pm 5,7 \times 10^4$ x fenofibrato: $6,6 \times 10^2 \pm 8,2 \times 10^3$).

Figura 25 - Expressão relativa dos genes TcasILP2 (A) e TcasSK (B) da cabeça de larvas mantidas em dieta *high fat* por 168 horas e depois transferidas para uma dieta suplementada com fenofibrato por 48 horas, comparadas ao grupo controle. As barras representam média \pm D.P. da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente pelo teste ANOVA *one-way*, $p < 0,05$.



Fonte: Os autores, 2020.

Esse pode ser considerado um caso típico de inflexibilidade metabólica, em que o maior suprimento lipídico proporcionado pela dieta *high fat* não foi balanceado por mecanismos reguladores, causando, entre outras alterações comuns na Síndrome Metabólica, a hiperinsulinemia, uma vez que há um aumento na expressão de TcasILP2 e há um excesso de açúcares totais, o substrato. Assim, o aumento circulante de macronutrientes, como açúcares (principalmente trealose), triacilglicerol e colesterol, pode levar o organismo a uma condição de estresse metabólico, devido à lipotoxicidade.

Nos insetos, a insulina é um hormônio que regula a alimentação de forma central, respondendo aos nutrientes, levando à diminuição do consumo de alimentos; e periférica, atuando nos tecidos para promover a absorção de glicose e gordura. A sinalização de ILP também está envolvida na regulação do comportamento alimentar de insetos (LIN, YU, SMAGGHE; 2016). Os resultados obtidos corroboram fortemente com o exposto, uma vez que o aumento no suprimento lipídico regulou positivamente a expressão de ILP que, de maneira central, diminuiu o consumo de alimentos, identificado através da redução da Taxa de Consumo de Alimentos (TCR - Figura 22B), e a nível periférico, promoveu aumento na absorção dos lipídios ingeridos, refletido pela alta Eficiência de Conversão do Alimento Ingerido (ECI - Figura 22C) e a quantidade expressiva de TAG armazenado no corpo gorduroso (Figura 23A).

De maneira coordenada, o aumento da expressão de TcasILP2 também provocou maior expressão de TcasSK, onde a sinalização de saciedade contribuiu para a redução significativa da Taxa de Consumo Relativo (TCR - Figura 22B). Corroborando esses resultados, Yu,

Nachman e Smagghe (2013) utilizaram *T. castaneum* como modelo experimental e obtiveram respostas semelhantes, pois foi observado um aumento drástico na ingestão de alimentos, induzido pelo silenciamento da SK, apoiando seu papel na regulação da ingestão de alimentos. Haber et al. (2001) explicaram a modulação da secreção de insulina por ácidos graxos em mamíferos, onde a exposição aguda à glicose e à Ácidos Graxos Livres (AGL) promoveu a secreção de insulina. No entanto, a exposição crônica a altas concentrações de AGL ou glicose pode levar à inibição da secreção de insulina, caracterizando a Resistência à insulina comum em Diabetes tipo 2.

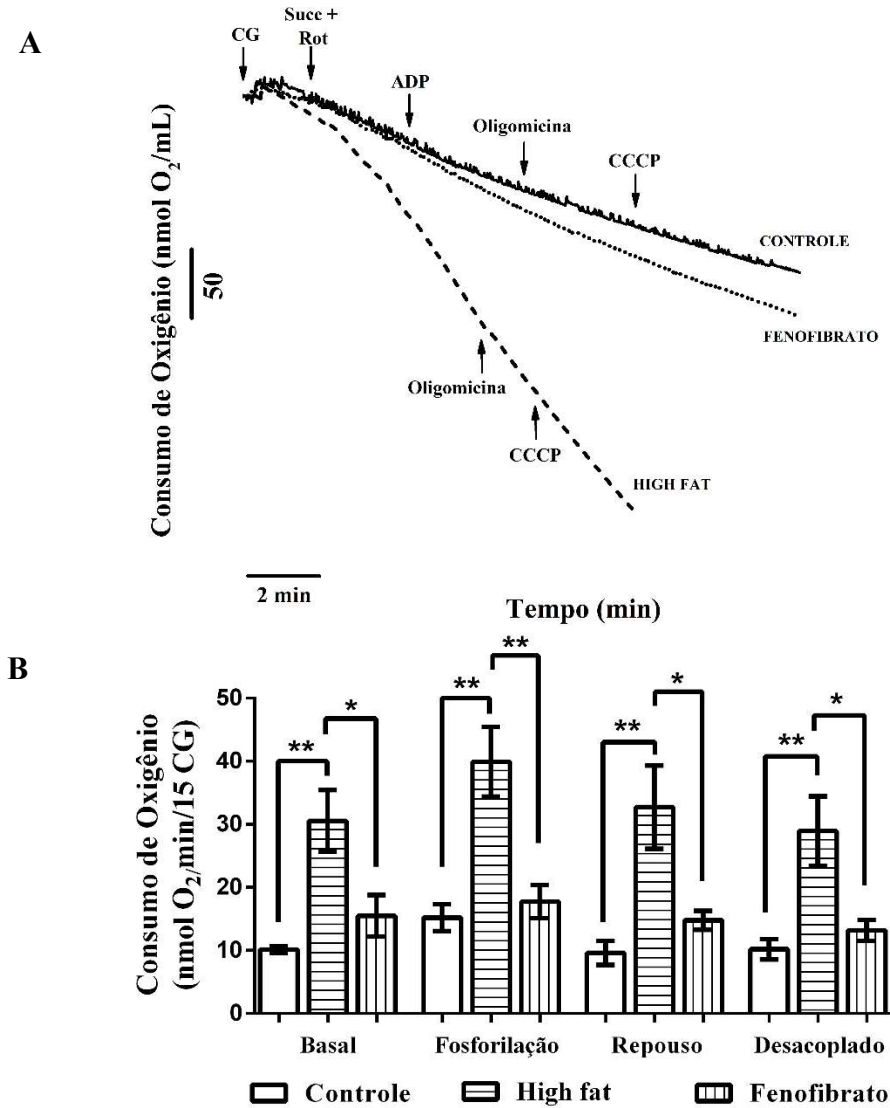
Considerando a situação de inflexibilidade metabólica, constatada por estas alterações bioquímicas em decorrência da suplementação lipídica, e que as mitocôndrias são as organelas responsáveis pela oxidação dos lipídios (NELSON; COX, 2014), é válido analisar os mecanismos de regulação mitocondrial em tais condições.

Síndrome Metabólica causa distúrbios no metabolismo bioenergético

Distúrbios metabólicos, como obesidade e resistência à insulina, têm uma relação específica com disfunções mitocondriais do complexo II. Nas mitocôndrias de modelos murinos mantidos em dieta hiperlipídica, houve uma redução de 70% na atividade do complexo II/SDH (SVERDLOV et al., 2015). Da mesma forma, em indivíduos com obesidade severa, identificou-se diminuição na atividade desse complexo enzimático (NGO et al., 2018). Em vista disso, a atividade mitocondrial foi analisada, utilizando especificamente Succinato como substrato para o complexo II e rotenona como bloqueador para o complexo I, para evitar o fluxo reverso de prótons.

Os resultados obtidos demonstram que as mitocôndrias de larvas mantidas em dieta *high fat* por 168 horas apresentam maior consumo de oxigênio em todos os estados respiratórios (Figura 26). Desta forma, pode-se inferir que o estresse metabólico causado pelo aumento de triacilglicerol nos corpos gordurosos levou a um maior desgaste mitocondrial. Por outro lado, a suplementação com fenofibrato por 48 horas foi capaz de reduzir a atividade mitocondrial a níveis semelhantes aos encontrados no grupo controle.

Figura 26 - Respiração mitocondrial analisada utilizando substrato para o complexo II. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes, mostrando maior consumo de O_2 no corpo gorduroso permeabilizado de larvas mantidas em dieta *high fat* (A) e velocidades de aumento do consumo de oxigênio nos estados: Basal, Fosforilação, Repouso e Desacoplado (B). As barras representam a média \pm D.P da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente pelo teste ANOVA *one-way*, $p < 0,05$.



Fonte: Os autores, 2020.

A restauração da respiração mitocondrial através do fenofibrato pode ser entendida sob duas perspectivas: *i*) indireta, uma vez que o estímulo da lipólise reduz o volume de triacilglicerol armazenado nos corpos gordurosos, com conseqüente redução da peroxidação lipídica ou β oxidação; *ii*) diretamente nos mecanismos de regulação mitocondrial. Neste último, estudos anteriores já declararam a interferência do fenofibrato nas mitocôndrias isoladas de ratos, por meio de uma diminuição súbita e severa na respiração dessas organelas, em particular, inibindo a atividade do complexo I (ZUNGU; FELIX; ESSOP, 2006). No entanto,

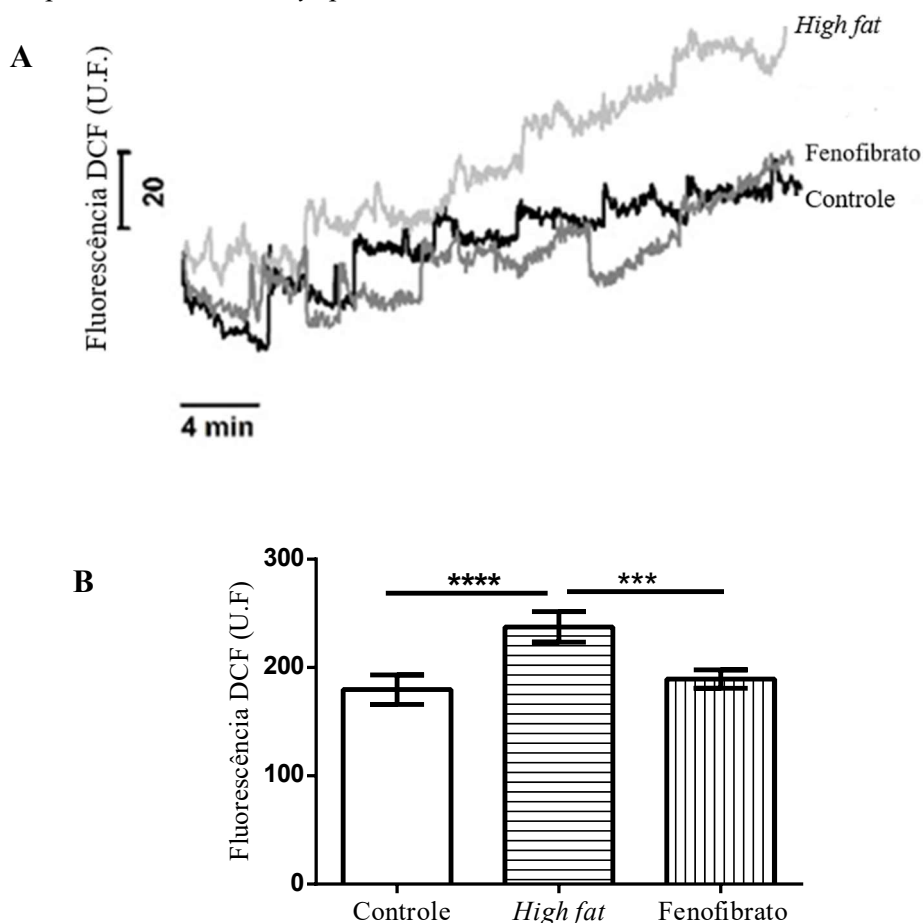
em nossas análises, observamos a capacidade desse medicamento em reduzir a atividade do complexo II, após estímulo com dieta hiperlipídica.

Alterações na cadeia respiratória estão intimamente relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente se considerarmos que a causa destas alterações advém do acúmulo de lipídios, devido à sua lipotoxicidade. Assim, lipídios que se acumulam nas proximidades das mitocôndrias são vulneráveis à oxidação, denominada peroxidação lipídica, um processo induzido pelas EROs que resultam em espécies lipídicas oxidadas e atuam como mediadores lipídicos bioativos. Por serem mais polares que os lipídios precursores, os peróxidos lipídicos podem perturbar as bicamadas da membrana, afetando sua estrutura e interferindo nas funções intracelulares, diminuindo a fluidez, inativando as proteínas ligadas à membrana e, finalmente, levando à destruição da membrana (WONG-EKKABUT et al., 2007).

As disfunções mitocondriais e o conseqüente aumento na geração de EROs estão fortemente relacionadas às alterações presentes na Síndrome Metabólica, como as encontradas neste estudo: hiperinsulinemia, hiperglicemia, distúrbios do metabolismo lipídico e obesidade. Assim, a geração de EROs foi analisada nas mitocôndrias permeabilizadas dos corpos gordurosos das larvas em estudo, utilizando a sonda H₂DCF, que, embora não seja específica para EROs, tem sido amplamente utilizada (HEMPEL et al., 1999; DIKALOV; HARRISON, 2014).

Os resultados obtidos permitiram identificar que as mitocôndrias permeabilizadas das larvas expostas à dieta *high fat* apresentavam maior emissão de fluorescência, ou seja, maior geração de EROs (Figura 27). Por outro lado, a análise dos grupos mantidos com a suplementação de fenofibrato mostrou uma redução na geração de EROs a níveis muito próximos aos observados no grupo controle.

Figura 27 - Medida da geração de espécies reativas de oxigênio via oxidação do H₂DCFDA por mitocôndrias permeabilizadas dos corpos gordurosos das larvas mantidas em uma dieta *high fat* e então transferidas para dieta suplementada com fenofibrato, comparada ao controle. Gráfico representando 3 experimentos independentes, realizados em triplicata (A) e presença de ERO detectada nos grupos de análise (B). As barras representam a média \pm D.P. da média de 3 determinações. *: Significativamente diferente pela ANOVA *one-way*, $p < 0,05$.



Fonte: Os autores, 2020.

De maneira semelhante a este estudo, a associação entre peroxidação lipídica, ERO e Síndrome Metabólica também foi comprovada através de um modelo murino de obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica, onde se observou que os distúrbios decorrentes da inflexibilidade metabólica são devidos ao estresse oxidativo no tecido adiposo perivascular causada pelo aumento da produção de O_2^- e H_2O_2 , agravando os riscos cardiovasculares (KETONEN et al., 2010). Da mesma forma, em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura, houve um aumento na disfunção endotelial no tecido adiposo perivascular causado por um aumento na produção de O_2^- (GIL-ORTEGA et al., 2009).

Semelhante ao fenofibrato, que demonstrou ter vários mecanismos de ação associados ao metabolismo lipídico (GUEDES, 2012), a insulina também foi capaz de aumentar a atividade do complexo II nas mitocôndrias adipocitárias do tecido subcutâneo de indivíduos com

obesidade grave (NGO et al., 2018), demonstrando assim a necessidade de mais pesquisas para provar (ou não) a eficácia desse estimulante da lipólise para além da hipertrigliceridemia.

Apesar de não proporcionar aumento da mortalidade, as disfunções bioenergéticas, gênicas e bioquímicas induzidas pelo aumento do consumo de lipídios comprometeram o desenvolvimento das larvas, reduzindo o número de insetos que atingiram a idade adulta (Figura Suplementar 2S), reforçando o poder lipotóxico das EROs e a importância das mitocôndrias na regulação da flexibilidade metabólica.

Além do acúmulo de triacilglicerol no corpo gorduroso das larvas mantidas com dieta hiperlipídica, outros fatores podem estar relacionados à disfunção mitocondrial, como o aumento do colesterol total presente na hemolinfa. Essa inferência corrobora estudos em células gordurosas obesas, onde níveis reduzidos de HDL-colesterol e altas concentrações de colesterol em macrófagos (ALLEN; GRAHAM, 2012) estão relacionados à redução da oxidação β , enzimas da cadeia de transporte de elétrons e atividade do ácido cítrico ciclo (FROMENTY et al., 2004), como causas de disfunções mitocondriais.

6.4 Conclusões

Ao final deste estudo, considera-se que a inflexibilidade metabólica desenvolvida como resultado da dieta hiperlipídica provoca alterações bioquímicas (hipertrigliceridemia, hiperglicemia e hipercolesterolemia), alterações estruturais (obesidade) e microscópicas (acúmulo de triacilglicerol nas gotículas lipídicas), que se juntam à hiperinsulinemia (altos níveis de TcasILP2 e hiperglicemia - aumento dos açúcares totais) para compor a SM. Tais disfunções causam lipotoxicidade com um consequente aumento na geração de EROs. Diante de tais distúrbios, há um aumento da atividade respiratória mitocondrial como mecanismo compensatório para reduzir a produção dessas espécies reativas e diminuir o estresse metabólico.

A suplementação com fenofibrato atua na manutenção da homeostase, indiretamente, estimulando a lipólise e mitigando as alterações observadas na síndrome metabólica, e/ou diretamente, através de mecanismos que regulam especificamente a atividade mitocondrial.

Como lacunas observadas nesses estudos e perspectivas futuras, destaca-se a necessidade de analisar a expressão gênica do Receptor de Insulina (TcasInR), como forma de aprofundar o comprometimento dessa inflexibilidade metabólica nas vias reguladoras da insulina. Também aponta-se para a necessidade da determinação da β -oxidação e a análise da

expressão de genes reguladores do metabolismo mitocondrial como forma de estudar o mecanismo de ação do fenofibrato no metabolismo mitocondrial e Síndrome Metabólica.

A concretização dos objetivos definidos para esta análise, através da aplicação biotecnológica do inseto *Tribolium castaneum*, comprova sua ampla e emergente utilização como modelo alternativo de baixo custo e alto desempenho em estudos de metabolismo lipídico e bioenergética mitocondrial.

6.5 Agradecimentos

Este trabalho foi financiado com recursos do Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem ao Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos – UFRJ pela realização do ensaio de microscopia.

Referências

ALLEN, A. M.; ANNETTE, G. Mitochondrial function is involved in regulation of cholesterol efflux to apolipoprotein (apo) AI from murine RAW 264.7 macrophages. **Lipids in health and disease**. v. 11, n. 1, p. 169, 2012.

ALVES-BEZERRA, M.; et al. Adipokinetic Hormone Receptor gene identification and its role in triacylglycerol metabolism in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2015.

AUCOUTURIER, J.; DUCHÉ, P.; TIMMONS, B. W. Metabolic flexibility and obesity in children and youth. **Obes Rev**. v. 12, n. 5, p. 44–53, 2011.

DIKALOV, S. I.; HARRISON, D. G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. **Antioxidants & redox signaling**. v. 20, n. 2, p. 372-382, 2014.

FARONI, L. R.; FRABETTI, D. R. **Principais pragas de grãos armazenados**. Net, Minas Gerais, out. 2009. Disponível em: <http://www.centreinar.org.br>. Acesso em: 10 jun. 2018.

FROMENTY, B.; et al. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. **Diabetes & metabolism**. v. 30, n. 2, p. 121-138, 2004.

GIL-ORTEGA, M.; SOMOZA, B.; ARANGUEZ, I.; RUIZ-GAYO, M.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M. S. Changes in resistance artery function during the development of diet-induced obesity. **Hypertension**. v. 54, p. 105–6, 2009.

GONDIM, K. C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and**

Molecular Biology. v. 101, n. 7, p. 108–123, 2018.

GREEN, D. R.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. **Science.** v. 333, n. 6046, p. 1109–1112, 2011.

GRILLO, L. A. M.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera : Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** v. 37, n 6, p. 579–588, 2007.

GRILLO, L. A. M.; PONTES, E.G.; GONDIM, K.C. Lipophorin interaction with the midgut of *Rhodnius prolixus*: characterization and changes in binding capacity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology.** v. 33, n. 4, p. 429–438, 2003.

GUEDES, V. P. O. **Farmacologia clínica dos antidislipidémicos.** Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina). Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2012. 60 p.

HEMPEL, S. L.; BUETTNER, G. R.; O'MALLEY, Y. Q.; WESSELS, D. A.; FLAHERTY, D. M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic Biol Med.** v. 27, p. 146–159, 1999.

HABER, E. P. et al. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 45, p. 219–227, 2001.

HASELTON, T.; FRIDELL, Y. W. C. Adult *Drosophila melanogaster* as a model for the study of glucose homeostasis. **AGING,** v. 2, n. 8, p. 23–26, 2010.

HEIER, C.; KÜHNLEIN, R. P. Triacylglycerol Metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics,** v. 210, n. 12, p. 1163–1184, 2018.

INSUA, J. L.; LLOBET, E.; MORANTA, D.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, C.; TOMÁS, A.; GARMENDIA, J.; BENGOCHEA, J. A. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. **Infect Immun.** v. 81, n. 10, p. 3552–65. DOI: 10.1128/IAI.00391-13. 2013.

KETONEN, J.; TARU, P.; EERO, M. Caloric restriction reverses high-fat diet-induced endothelial dysfunction and vascular superoxide production in C57Bl/6 mice. **Heart and vessels.** v. 25, n. 3, p. 254–262, 2010.

LIN, X.; YU, N.; SMAGGHE, G. Insulin receptor regulates food intake through sulfakinin signaling in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Peptides.** v. 80, n. 6, p. 89–95, 2016.

LOCKE, A. E.; KAHALI B, B. S.; et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature.** v. 518, n. 7538, p. 197–206. doi: 10.1038/nature14177, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 1274 páginas, 2014.

- NGO, D. T. M.; SVERDLOV, A. L.; KARKI, S.; et al. Oxidative modifications of mitochondrial complex II are associated with insulin resistance of visceral fat in obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 316, n. 2, p. 168–177. doi: 10.1152/ajpendo.00227, 2018.
- OLSON, K. A.; SCHELL, J. C.; RUTTER J. Pyruvate and metabolic flexibility: illuminating a path toward selective cancer therapies. **Trends Biochem Sci.** v. 41, n. 3, p. 219–230, 2016.
- RICHARDS, S.; et al. *Tribolium* genome sequencing consortium. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature.** v. 452, p. 949–955, 2008.
- SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Curr Hypertens Rep.** v. 20, 2018.
- SILVA, M. K. H.; et al. **Método de preparação do inseto *Tribolium castaneum* (Coleóptero: Tenebrionidae) como modelo de baixo custo para estudo da Síndrome Metabólica.** Depositante: Universidade Federal de Alagoas. BR 10 2020 009276 6. Depósito: 11 de maio de 2020.
- SMITH, R. L.; SOETERS, M. R.; WÜST, R. C. I.; HOUTKOOPE, R. H. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. **Endocr Rev.** v. 39, n. 4, p. 489–517. doi:10.1210/er.2017-00211, 2018.
- SVERDLOV, A. L.; ELEZABY, A.; BEHRING, J. B.; et al. High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. **J Mol Cell Cardiol.** v. 78, p. 165–173. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.07.018, 2015.
- VIDIGAL, F. C.; BRESSAN, J.; BABIO, N.; SALAS-SALVADÓ, J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health.** v.13, p.1198, 2013.
- WILK, A.; WYCZECHOWSKA, D.; ZAPATA, A.; et al. Molecular mechanisms of fenofibrate-induced metabolic catastrophe and glioblastoma cell death. **Mol Cell Biol.** v. 35, n. 1, p. 182–198. doi:10.1128/MCB.00562-14, 2015.
- WONG-EKKABUT, J.; XU, Z.; TRIAMPO, W.; TANG, I. M.; TIELEMAN, D. P.; MONTICELLI, L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. **Biophys J.** v. 93, n. 12, p. 4225–4236. doi: 10.1529/biophysj.107.112565, 2007.
- YU, N.; NACHMAN, R. J.; SMAGGHE, G. Characterization of sulfakinin and sulfakinin receptor and their roles in food intake in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **General and Comparative Endocrinology.** v. 188, n. 6, p. 196-203, 2013.
- ZUNGU, M.; FELIX, R.; ESSOP, M. Faadiel Wy-14,643 and fenofibrate inhibit mitochondrial respiration in isolated rat cardiac mitochondria. **Mitochondrion.** v. 6, n. 6, p. 315-322, 2006.

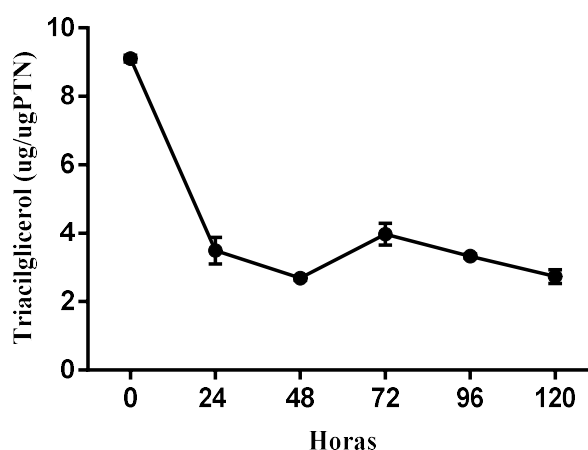
Material Suplementar

Tabela Suplementar 1S - Gene, número de referência NCBI/referência, sequência de iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados pelos iniciadores utilizados.

Gene/Símbolo	Número de Acesso (NCBI) /Referência	Sequência de iniciadores	Tamanho do fragmento (bp)
Sulfaquinina (TcasSK)	EFA04708.1	F-GGCAGCGATTAAGCCAATAA R-TGCAAAATTTATTACCAGCCATT	~200
Peptídeo Semelhante à Insulina 2 (TcasILP2)	SHENG et al., 2011	F- TTACGTCTGGTCTTCACCGCACAT R-TGGTTGGGTTTGGATTTCGGAGAGT	~200
Proteína Ribossomal S3 (TcasPS3)	NP_001165863.1	F-CCGTCGTATTCGTGAATTGACTT R-TCTAAGAGACTCTGCTTGTGCAATG	~200

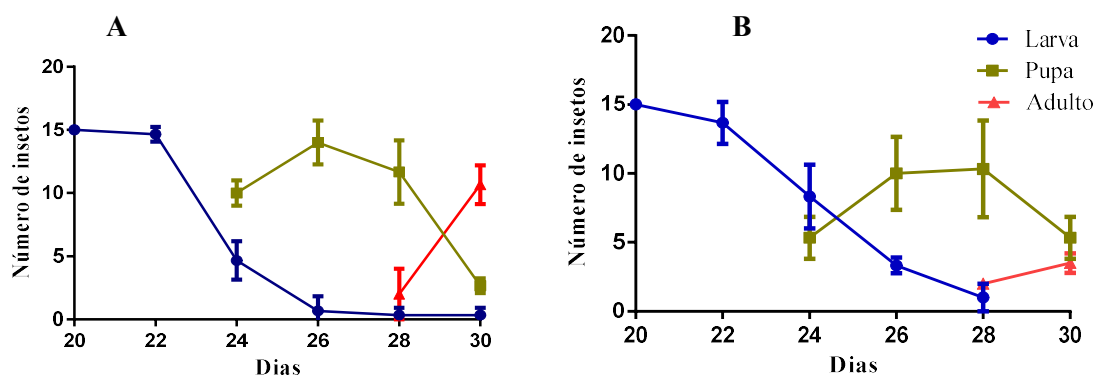
Fonte: Os autores, 2020.

Figura Suplementar 1S - Redução do conteúdo de triacilglicerol no corpo gorduroso das larvas mantidas em uma dieta suplementada com fenofibrato por 120 horas. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações.



Fonte: Os autores, 2020.

Figura Suplementar 2S - Mudança no processo de metamorfose de larvas mantidas em dieta hiperlipídica (A) quando comparadas ao grupo controle (B), com diminuição do número final de insetos na forma de pupas e adultos. As barras representam média \pm desvio padrão da média de 3 determinações.



Fonte: Os autores, 2020.

7 miR-33 and lipid metabolism: focus on insects as a model

miR-33 and lipid metabolism: focus on insects as a model

¹ SILVA, Meirielly Kellya Holanda

² BATALHA, Mariana de Macêdo Costa

³ ARAÚJO, Mykaella Andrade

⁴ NASCIMENTO, Jean Phellipe Marques

³ JUNIOR, Karlos Antônio Lisboa Ribeiro

⁵ DORNELAS, Camila Braga

⁵ GRILLO, Luciano Aparecido Meireles

Since the discovery of microRNAs (miRs) in the *Caenorhabditis elegans*, these molecules have gone from cytoplasmic waste to well-known post-transcriptional regulators of various physiological and pathological processes, such as miR-33, largely associated with regulation of cholesterol metabolism, oxidation of the proteins, fatty acids and insulin signaling, being targets of functional research and therapeutic searches. However, a current challenge is the replacement of vertebrate models, thus emerging species of the Insect class. This Bioinformatics study highlights, among insects, the rising model *Tribolium castaneum*, a grain pest that is more appropriate for studying the conserved function of miRs than other insects such as *Drosophila*. *Tribolium castaneum* has a mature sequence homologous to *Homo sapiens* miR-33a and, in phylogenetic analysis, is evolutionarily closer to man when compared to drosophils. In *T. castaneum* one can study cholesterol metabolism and transport (ABCG1), cholesterol homeostasis (ZEB1), fatty acid oxidation (HADHB and CROT), fatty acid transport and mitochondrial oxidation (CPT1A), and associated mechanisms insulin signaling (IRS2), as these miR-33 target genes in humans present similarity in this insect. In addition, this model can also be used to improve therapeutic approaches, such as miR-33 functional manipulation, as gene silencing by miRs inhibitors injection has proven systemic effects. Thus, besides presenting low cost and easy manipulation, it is proven by Bioinformatics tools that *Tribolium castaneum* is an alternative model to vertebrates in the study of lipid metabolism by miR-33, with results that can be mimicked in humans.

Keywords: Insect. Bioinformatics. mir-33. Metabolism. Lipids.

7.1 Introduction

MicroRNAs (miRs) are small non-coding RNAs which can indirectly regulate post-transcriptional gene expression by binding to messenger RNAs (mRNAs) of corresponding target genes and degrade or inhibit their translation (BUSHATI; COHEN, 2007; JEFFRIES; SAWALHA, 2015), as well as through interactions with epigenetic processes (PESCHANSKY; WAHLESTEDT, 2014).

Despite the recognized regulatory role of miRs, their importance in the scientific world is a recent discovery, a few years ago these molecules were still seen as cytoplasmic waste, results of the degradation of molecular transcripts (LIN; MILLER; YING, 2006). Today, however, it is well known that, although small, they have the ability to orchestrate numerous cellular processes responsible for the maintenance of life and the genesis of diseases.

In this sense, miR-33 is the most described miR in lipid metabolism studies (NORATA et al., 2012) and its sequences are highly conserved in insects, thus being low cost models and high reproducibility, considering the close relationship of homology between the species.

Insects, such as *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), have characteristics that facilitate their use as experimental models, mentioning the short generation time, low maintenance cost (BROWN et al. 2009), sequenced and available genome (RICHARDS et al., 2008; ADAMS et al., 2000), as well as the ease of genetic manipulation through increasingly sophisticated techniques (MARCO et al., 2010). However, greater conservation in protein sequences has highlighted *T. castaneum* as an ideal model for evolutionary analysis of genes between vertebrates and invertebrates (SAVARD et al., 2006), it is therefore an important model with conserved miR-33 sequences and human-like target genes.

Thus, this Bioinformatics analysis presents the objective of proposing insects as alternative models for studies of the association between miR-33 and lipid metabolism, with special focus on the rising model, *Tribolium castaneum*.

7.2 Materials and Methods

In silico miR-33 sequence identification

We searched for miR-33 precursor sequences in insects from two bases, GenBank at the National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and miRBase (<http://www.mirbase.org/>), specific for miR.

Sequence alignment and secondary structure

FASTA sequences of miR-33 precursors identified in insects and humans (*Homo sapiens* - miR-33a) were aligned through the Clustal Omega program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), using the RNA specification and character count. The secondary structure produced by the miR-33 family seed sequence (RF00667) was analyzed using the R-scape method (RIVAS et al., 2016) using the Rfam program (<http://rfam.xfam.org/>).

Phylogenetic Inference

Phylogenetic analyses were performed by the Maximum Likelihood method, applying the Generalised time reversible (GTR) nucleotide substitution model using the SeaView 4 software (Gouy et al., 2009). The phylogenetic tree was constructed based on the multiple alignment of insect and human miRNAs precursor sequences. The reliability of the generated tree was obtained using the bootstrap support statistical test with a value of 1000 random replicates. The *Caenorhabditis elegans* miR-8199 was used as outgroup.

Prediction of miR-33 transcription in *Tribolium castaneum*

The miR-33 precursor sequences in *T. castaneum* available from GenBank and miRBase were subjected to the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn), both of which had an E: 2-44 value and 100% Query cover. Given this similarity, the mature sequence and the gene responsible for its transcription were identified in GenBank, while its stem-loop structure was made available in miRBase.

Prediction of miR-33 target genes in *T. castaneum*

Because there is no database capable of predicting miR-33 target genes in the insect *Tribolium castaneum*, searches were conducted in the PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) and Web of Science (<http://wokinfo.com/>) databases with the keywords: miR-33 and microRNA-33; filtering publications related to lipid metabolism. Among the selected articles, we analyzed the target genes identified through functional studies or prediction of Bioinformatics, after which we searched for similar genes in

the NCBI nucleotide option base, where the name of the investigated gene AND *Tribolium* was entered in the search space, then the option "genes with similar protein architecture" was selected. In the new interface, a new search was carried out in the taxonomic tree field with the desired species, *Tribolium castaneum*.

7.3 Results and Discussion

miR: a big breakthrough in a small invertebrate

Studying the control of larval development of the free-living hermaphrodite nematode *Caenorhabditis elegans*, researchers observed that the *lin-4* gene caused temporary inhibition of *lin-14* translation during L1 and L2 larval stages through antisense interaction with certain sequences from the 3'UT R region of the *lin-14* gene. However, as *lin-14* transcript levels, such as LIN-14 protein, remained constant throughout larval development, it was hypothesized that *lin-4* could bind to *lin-14* mRNA in the cell cytoplasm. and inhibit their translation by direct interaction with translational componentes (WIGHTMAN et al., 1991).

From these findings, two groups of researchers have worked to elucidate the mechanisms by which *lin-4* regulated the transcription of LIN-14. The set of results obtained showed that the increase of *lin-4* activity corresponded to the reduction of LIN-14 protein transcription, that is, a post-transcriptional negative regulation of *lin-4*, a small antisense RNA, by hybridization to the 3 'UTR region of its target gene, *lin-14* (WIGHTMAN ET AL., 1993; LEE et al., 1993).

Thus, *lin-4*, with approximately 21 base pairs, was the first microRNA to be discovered, with regulatory function in the development of *C. elegans*. Continuously, knowledge about post-transcriptional regulation mediated by small RNAs has evolved and new discoveries have been made using *C. elegans*, such as the fact that *lin-4* also regulated the expression of another gene, *lin-28* (MOSS et al., 1997), the identification of another post-transcriptional regulatory RNA, *let-7*, and its target gene *lin-41* (REINHART et al., 2000), in addition to the knowledge that the mature miR sequence produced by the action of the dicer enzyme on the loop-like precursor may be located on either the 3 'or 5' arms (LAU et al., 2001).

In addition to functional studies, research with *C. elegans* also showed that miRs were evolutionarily conserved between species. The *let-7* sequence in *C. elegans* aligned perfectly with *Drosophila melanogaster*, showing partial alignment with various genomic regions *Homo sapiens* (PASQUINELLI et al., 2000). Several other miRs later identified in *C. elegans* had a

close homology relationship between *Drosophila*, mice and humans (LEE; AMBROS,2001; LAU et al., 2001).

A study using *D. melanogaster* as a model elucidated questions regarding the expression of microRNAs, stating that there is no definite pattern for its expression, which may be constitutive, period-specific or tissue-specific (LAGOS-QUINTANA et al., 2001). This result, coupled with the proven evolutionary conservation of these small miRs, supported the hypothesis that differences in the expression pattern of these miRs could reflect a wide range of regulatory pathways beyond the limits of developmental control.

Thus, research with *C. elegans* (WIGHTMAN et al., 1993; LEE et al., 1993; MOSS et al., 1997; REINHART et al., 2000; PASQUINELLI et al., 2000; LAU et al., 2001; LEE, AMBROS, 2001) and *D. melanogaster* (LAGOS-QUINTANA et al., 2001) as experimental models, due to characteristics such as short life cycle, simple maintenance and low cost, have provided a great expansion in the knowledge of biological science in this new millennium, demonstrating that the size of these molecules is inversely proportional to their importance for the regulation of metabolic pathways that coordinate various physiological and pathological processes.

From the initial research with *C. elegans* and the *D. melanogaster* insect, showing that these miRs were not cytoplasmic waste, but responsible for regulating the development of a microorganism, many questions have been elucidated and others emerge every day. Recently, a much discussed point has been the intrinsic relationship between miRs and the pathophysiology of certain disorders, with special emphasis on its ability to regulate metabolic pathways and influence the genesis of lipid changes.

miR-33 and lipid metabolism: between loops and knots

Changes in lipid metabolism in humans, such as increased triglycerides, increased low-density lipoprotein (LDL), and decreased high-density cholesterol (HDL-cholesterol) are known risk factors for the development of metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus type 2, stroke, coronary heart disease, atherosclerosis, among others (SAKLAYEN, 2018).

Thus, in order to understand how parallel metabolic pathways correlate and result in the onset of such disorders, new findings have recently emerged showing that incorrect regulation of lipid metabolism has the ability to promote metabolic diseases. In this perspective, are known classic transcriptional regulators such as sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and liver X-receptors (LXRs) (Yoshikawa et al., 2001), however, several miRs have also been

proven as post-transcriptional regulators, influencing the expression of target genes associated with lipid homeostasis.

In this way, several miRs have already been identified as capable of interfering with lipid metabolism, among them, the miR-122, miR-33, miR-106, miR-758, miR-26, miR-370, miR-378/378, miR-27, miR-103, miR-107, miR34a, miR-143 e miR-335 (NORATA et al, 2012). The relevance of miR-33 is highlighted, given the extensive research that proves its association in the control of plasma lipoprotein levels.

The miR-33 family is one of the best described examples of non-coding RNA-mediated regulation of lipid metabolism (MARQUART et al, 2010; NAJAFI-SHOUSHTARI et al, 2010; RAYNER et al, 2010). In these discussions, several questions were raised, one of which is whether miR-33 has a cause or effect relationship on lipid metabolism, and it is then stated that regulation of miR-33-mediated gene expression is probably a cause (and not a consequence) of altered lipid profiles (DEKKERS et al., 2016).

miR-33 is a family of precursor miRs, expressed in various species, being in humans, formed by two components, miR-33a and miR-33b, both located in intronic regions of the *Srebp-2* and *Srebp-1* genes, respectively, being directly related to lipid metabolism (MARQUART et al, 2010; NAJAFI-SHOUSHTARI et al, 2010; RAYNER et al, 2010). miR-33a is located at intron 16 of the *Srebp-2* gene on chromosome 22, while miR-33b is encoded at intron 17 of the *Srebp-1* gene on chromosome 17. The two mature isoforms of this miR show similarity in their sequences, which leads us to believe that they act on similar target genes (HORTON et al., 2002; RAYNER et al, 2010; DÁVALOS et al, 2011).

Concerning lipid metabolism, we should highlight the sterol regulatory binding proteins (SREBPs), SREBP-1 and SREBP-2, which bind to the promoter region and activate the transcription of many genes involved in biosynthesis and uptake. cholesterol and fatty acids, as well as in the production of phospholipids and triglycerides (HORTON et al, 2002; DÁVALOS et al, 2011). According to Horton et al. (2002), the function of the *Srebp-2* gene is associated with the regulation of cholesterol metabolism by controlling the transcription of genes involved in its biosynthesis. It also regulates cholesterol uptake through the low density lipoprotein receptor (LDLr), which imports blood cholesterol. *Srebp-1* regulates the transcription of genes involved in fatty acid metabolism, including their synthesis (WU et al, 2019).

As for miRs, in addition to being co-transcribed into different genes, isoforms also have different functions. miR-33a, like SREBP-2, targets genes involved in cholesterol export. Similar to SREBP-1, miR-33a and miR-33b also regulate fatty acid metabolism and insulin signaling (RAYNER et al, 2010; DÁVALOS et al, 2011; YU et al, 2019).

The work developed by Dávalos et al. (2011) infers the joint action between miR-33a and its host genes *Srebp-2* and *Srebp-1* on *Drosophila* lipid metabolism, suggesting that SREBP-2 co-transcription and miR-33a or SREBP-1 and miR-33b regulate both cholesterol metabolism, fatty acid oxidation and insulin signaling, three of the major risk factors for the development of Metabolic Syndrome.

The miR-33a isoform is very conserved among many organisms, from insects such as *Tribolium castaneum* and *Drosophila melanogaster* to human vertebrates. miR-33b is not conserved in rodents (DÁVALOS et al, 2011). These findings are very relevant in the process of choosing the experimental model to be used during the study process with these RNAs.

A current challenge that faces ethical and economic aspects is the replacement of vertebrate models in scientific research for gene expression and manipulation assays. In this sense, several researches have been using insects as a model to which the results were later validated in mammals (ROTH; PORTER, 1964; TELFER, 1960 e 1961; DEMIR; DICKSON, 2005; SAKAI; KITAMOTO, 2006).

Insects as a model for miR-33 study

The use of vertebrate models generates relevant ethical issues and high maintenance costs (INSUA et al., 2013). On the other hand, the increasing number of researches using insects as an alternative model is based on its favorable characteristics, because, besides representing a significant class in the animal kingdom, several species present fast reproduction, high fecundity, short life cycles that allow fast generation intervals, which facilitates transgenerational studies. The fact that they are small favors the manipulation of their organs, besides having low maintenance costs, acceptable ethical aspects and systemic effects and easy investigation of interference RNA (RNAi), allowing gene silencing. Another favorable point is the database-accessible genome for some species, such as *T. castenum*, considered an emerging model, with gene sequences that show intense homology relationships with other species, including humans (RICHARDS et al., 2008; GRÜNWARD et al., 2013).

The Insect class is the largest animal group, with about 75% of all known species, with worldwide distribution and various regulatory mechanisms of life processes (CHOWANSKI et al., 2017). Another highlight for this class is its importance, both economically and biotechnologically, given that insects' discoveries can be reproduced in vertebrates, either directly, as a product, or insights into physiological processes and pathogens in humans, and provide insight into the mechanisms of development and discoveries of new biological control methods for insect pests (RATCLIFFE et al., 2011).

Within the range of studies that emerge from invertebrate models, insects become ideal models for investigating the regulation of metabolism, including those mediated by miRs. The ease of studying miRs using insects can be enhanced by open access to the miRs-specific miRBase database, which provides the precursor sequences of 77 species in which miR-33 has been identified (Table 2S - Supplementary Material). Regarding insects, GenBank has only 12 entries of this miR in different species, while miRBase has 24 miR-33 sequences in this class, as shown in table 7.

Table 7. miR-33 precursor sequence in insects available in miRBase and/or NCBI bases, with their access and identification codes.

Insects	miRBase ID	miRBase code	GenBank ID	GenBank code
<i>Aedes aegypti</i>	aae-mir-33	MI0013493	-	-
<i>Anopheles gambiae</i>	aga-mir-33	MI0033352	-	-
<i>Apis mellifera</i>	ame-mir-33	MI0005738	-	NR_034293.1
<i>Blattella germanica</i>	-	-	-	MF574964.1
<i>Bombyx mori</i>	bmo-mir-33	MI0012293	-	NR_107308.1
<i>Culex quinquefasciatus</i>	cqu-mir-33	MI0013620	-	-
<i>Daphnia pulex</i>	dpu-mir-33	MI0012243	-	-
<i>Dinoponera quadricaps</i>	dqu-mir-33	MI0037482	-	-
<i>Drosophila ananassae</i>	dan-mir-33	MI0008998	Dana-mir-33	XR_046045.1
<i>Drosophila erecta</i>	der-mir-33	MI0009086	-	-
<i>Drosophila grimshawi</i>	dgr-mir-33	MI0009149	Dgri-mir-33	XR_047042.1
<i>Drosophila melanogaster</i>	dme-mir-33	MI0000364	-	NR_048301.1
<i>Drosophila mojavensis</i>	dmo-mir-33	MI0009249	Dmoj-miR-33	XR_047729.1
<i>Drosophila persimilis</i>	dpe-mir-33	MI0009299	-	-
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	dps-mir-33	MI0001316	Dpse-mir-33	XR_053226.2
<i>Drosophila sechellia</i>	dse-mir-33	MI0009364	Dsec-mir-33	XR_048729.1
<i>Drosophila simulans</i>	dsi-mir-33	MI0009431	-	-
<i>Drosophila virilis</i>	dvi-mir-33	MI0009507	Dvir-mir-33	XR_048924.1
<i>Drosophila yakuba</i>	dya-mir-33	MI0009636	-	-
<i>Drosophila willistoni</i>	dwi-mir-33	MI0009614	-	-
<i>Heliconius melpomene</i>	hme-mir-33-1	MI0021775	-	-
<i>Manduca sexta</i>	mse-mir-33	MI0020978	-	-
<i>Nasonia vitripennis</i>	nvi-mir-33	MI0014718	-	NR_039001.1
<i>Polistes canadensis</i>	pca-mir-33	MI0037580	-	-
<i>Tribolium castaneum</i>	tca-mir-33	MI0008905	-	NR_036285.1

Fonte: Os autores, 2020.

The similarity between miR-33 sequences was observed by the alignment (figure 5.1) performed through the Clustal Omega program. The precursor sequences of this miR in insects

and *Homo sapiens* miR-33a were analyzed, considering that this isoform is highly conserved in several species (DÁVALOS et al, 2011). Similarly, the secondary structure produced by the miR-33 family seed sequence (RF00667) was also analyzed through the R-scape method (RIVAS et al., 2016), using the Rfam program (<http://rfam.xfam.org/>).

The alignment shown in Figure 5.1A demonstrates that the 5' arm is more conserved between the different insect and human species than the 3' arm, observed by the higher number of nucleotides with high degree of identity. Corroborating this, Figure 5.1C also demonstrates that the 5' arm has a larger number of conserved nucleotides (shown in red) than the 3' arm. That is, among all species with miR-33 analyzed, nucleotides highlighted in red have 97% conservation, a more significant number in the 5' arm than in the 3' arm. Already the nucleotides highlighted in black, have 90% conservation among species, also more significant in the 5' arm. Thus, it can be inferred that the 5' arm of miR-33 is evolutionarily more conserved among species

Figure 5.1. Alignment between miR-33 precursor sequences in different insect and human species (miR-33a) through the Clustal Omega program, (*) indicates identity between arm 5' (A) and 3' (B); secondary structure formed by the seed sequence of the miR-33 family, by the R-scape method by the Rfam (C) program, in which the nucleotides in red have 97% conservation, black 90% and gray 70%.

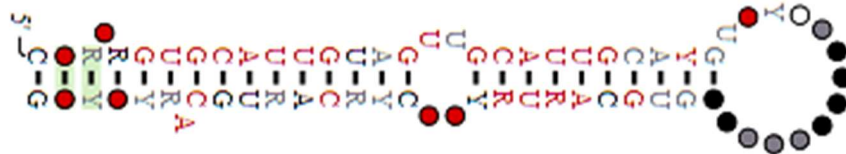
A

D.willistoni	-----GAAGUUACACGAAGGUGCAUUGUAGUCGCAUUGUCUGUG
D.persimilis	-----C-----GGAGAUACACGCAGGUGCAUUGUAGUCGCAUUGUCUGUC
D.pseudoobscura	-----CC-----GGAGATGACACGCAGGTGCATTGTAGTCGCATTGTCTGTC
D.ananassae	-----C-----GGAGATGTACACGCAGGTGCATTGTAGTCGCATTGTCTGTC
D.erecta	-----C-----AGAGAUACACGAAGGUGCAUUGUAGUCGCAUUGUCUGUC
D.yakuba	-----C-----AGAGAUACACGAAGGUGCAUUGUAGUCGCAUUGUCUGUC
D.melanogaster	CUCUUCCU---CU-----GGAGAUACACGAAGGUGCAUUGUAGUCGCAUUGUCUGUC
D.sechellia	-----C-----GGAGATGACACGAAGGTGCATTGTAGTCGCATTGTCTGTC
D.simulans	-----C-----GGAGAUACACGAAGGUGCAUUGUAGUCGCAUUGUCUGUC
D.mojavensis	-----T-----GGAGCTGTGACGGAGGTGCATTGTAGTCGCATTGTCTGTA
D.grimshawi	-----A-----GGAGCUGUCACGAAGGUGCAUUGUAGUCGCAUUGUCUGUC
D.virilis	-----U-----GGAGCUGUUACGGAGGUGCAUUGUAGUCGCAUUGUCUGUC
H.melpomene	-----GAAGACAA---ACUAAUUCGAGAGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCACUUG
B.mori	-----TAAAGCGAGAGTGCATTGTAGTTGCATTGCACCCGG
M.sexta	-----GUUAUGACGG---ACUAAUUCGGGAGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCACCUUG
T.castaneum	-----AGAAGA-TGAATATTATGATCTTAGGTGCATTGTAGTTGCATTGCATGTT
A.gambiae	-----GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCACUUA
A.aegypti	-----CCACCCGGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAC-UU
C.quinquefasciat	-----GGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCACGUU
D.pulex	-----ACACACUGGGGUGAGCCCGUGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCACGUU
N.vitripennis	-----TATGCAACGAAAATATTGTCTGCTACGAGAGTGCATTGTAGTTGCATTGCATGAA
H.sapiens-mir-33	-----CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAGUUU
B.germanica	-----GTGCATTGTAGTTGCATTGCATGTT
P.canadensis	-UGUUUCUUUGAAGUAUGCUUACCGUUGAGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCUGUG--
A.mellifera	-TATTTAT---TTGATTGCTTACCTGTTACAACGTGCATTGTAGTTGCATTGCATG--
D.quadriceps	-----UAUCUGUUACAAGUGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAGU--
	* ** * * * * *

B

D.willistoni	CUCCAAAAAAAAAACCCCCAGUUUCUAUUCAGGCAAUACAACUGCAGUGCAAGCUUCG
D.persimilis	CAUCU-----UG--AUUUCAGGCAAUACAACUGCAGUGCAAGCUCUG
D.pseudoobscura	CATCT-----TG--ATTTCAGGCAATACAAC TGCAATGCAAGCTCTG
D.ananassae	CCACT-----TG--C-TCCAGGCAATACAAC TGCAAGCTCTG
D.erecta	CCAAU-----UG--C-UUCAGGCAAUACAACUUCAGUGCAAGCUCUG
D.yakuba	CCAAU-----UG--C-UUCAGGCAAUACAACUUCAGUGCAAGCUCUG
D.melanogaster	CCAAU-----UG--C-UUCAGGCAAUACAACUUCAGUGCAAGCUCUG
D.sechellia	CCAAT-----TG--C-TTCAGGCAATACAAC TTCAAGCTCTG
D.simulans	CCAAU-----UG--C-UUCAGGCAAUACAACUUCAGUGCAAGCUCUG
D.mojavensis	TCCTT-----TATTCTCTGCGCAATACAAC TGCAAGCTCCG
D.grimshawi	C-AAA-----AAUUGCAUGCGGCAAUACAACUGCAGUGCAAGCUCUG
D.virilis	U-CAA-----AUUUGCCCGCGGCAAUACAACUGCAGUGCAAGCUCUG
H.melpomene	UUAAU-----UAUU-AUGUGCAAUUUUUCUACAAGCAAUUCUG
B.mori	TTCC-----ATTAACGTGCAATATGACTACAAGGCAAATCCCG
M.sexata	UUCGU-----AAUAAACGUGCAAUUUACUACAAGGCAAUUCUG
T.castaneum	AT-----TCAAAGTGCAAGTGTCTCTCCAGTGCAACTTAGC
A.gambiae	CCGUGUUGGCA-----A---CAGGUGCAGUACUUCUGCAAUGCAACCC---
A.aegypti	UUGCGUUCGAU-----AAC-ACGGUGCAAUACUUCUGCAAUGCAAGCCAGG
C.quinquefasciatus	UUGCGUUCGAA-----AAGUCCAGUGCAGUACUUCUGCAAUGCAAACCAGG
D.pulex	GUCAAUUCU-----UUGUUUCGCGCAAUGCUUCGGCAGUGCAACUCGGG
N.vitripennis	TATT-----TGAAAGTGCAAGTACTTCTGCAAGCTCTGCAACCCTTG
H.sapiens-mir-33a	CUGGUGG-----UACCCAUUGCAAUGUUUCCACAGUGCAUCACAG-
B.germanica	GTCATG-----AACTATGCAATACTTCTATAGTGCAACACC--
P.canadensis	-AAAUA-----CAACUAUGCAAUACUUCUACAGUGCAACUCCUG
A.mellifera	-AAATA-----TAACTATGCAATACTTCTACAGTGCAACTCTTG
D.quadriceps	-AAAUA-----UAACUAUGCAAUACUUCUACAGUGCAACUCCUG

*** * * **

C

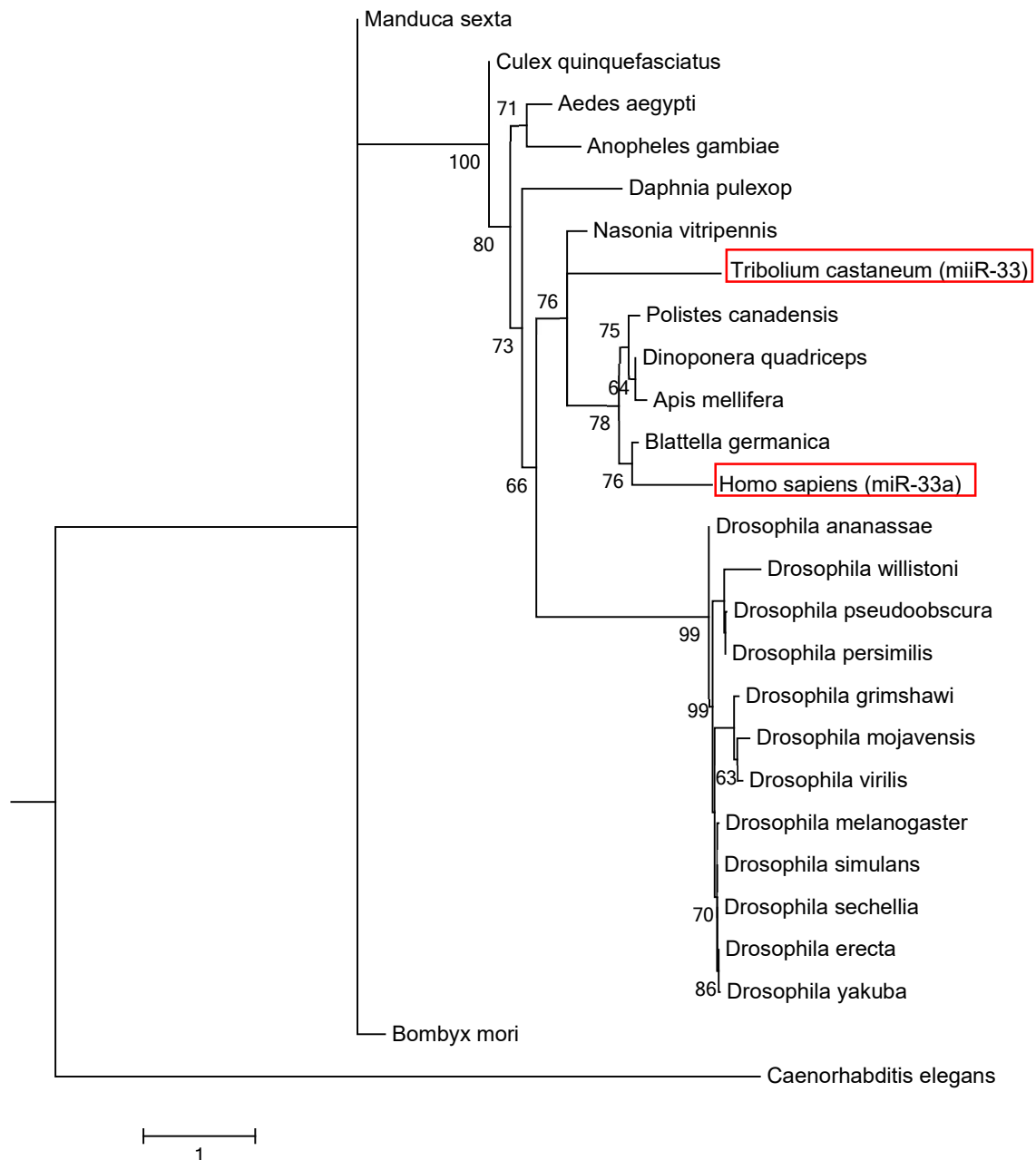
Fonte: Os autores, 2020.

From these miR-33 precursor sequences in insects, the phylogenetic tree was performed using the Maximum Likelihood method, shown in Figure 5.2, thus allowing to infer about the evolutionary proximity of this miR between insects and *Homo sapiens*. In this construction, preference was given to sequences available in the NCBI base, using miRBase as the secondary base.

Since the objective of the Maximum Likelihood method is to estimate the evolutionary rates of genes and genomes, as well as to interpret genomic data (ZIHENG, 2007), there is a greater evolutionary proximity between the sequences of *Homo sapiens* and *Tribolium*, when compared to species of *Drosophila*. Thus, it can be inferred that between these two widely used insects as alternative models, when it comes to miR-33 studies with mimicked results in humans, *T. castaneum* stands out. The positioning of the miR-33 sequence in *Tribolium castaneum* in the phylogenetic tree can be positively interpreted for its use as an experimental

model, considering a possible evolutionary conservation of its sequences and the proximity of its clade with *H. sapiens*.

Figure 5.2. Maximum likelihood phylogenetic tree generated by Seaview 4 software, built based on multiple alignment of miR-33 precursor sequences in insects, miR-33a in *Homo sapiens* and miR-8199 by *Caenorhabditis elegans* as out group. The nucleotide substitution model used was Generalised time reversible (GTR). Node numbers indicate percentage bootstrap values (1000 bootstraps).



Fonte: Os autores, 2020.

Despite the proven conservation of miR-33 sequences between insects and humans, this miR has had its functionality proven in few species of this class. Among the articles available in the Web of Science and PubMed databases, from the search with the keyword “miR-33 and

microRNA-33”, it appears that among all publications that relate this miR to lipid metabolism (Table 3S - Supplementary Material), only one research used insect (*Drosophila*) as an experimental model, which determined the role of miR-33 in its lipid homeostasis, demonstrating that the role of miR-33 in the regulation of fatty acid oxidation is conserved between *D. melanogaster* and humans (DÁVALOS, et al., 2011).

Apart from lipid metabolism, few functional studies of miR-33 have been performed on insects. In *Bombyx mori* (silkworm), one of the probable functions of miR-33 is associated with fibroin production (CAO et al., 2008), while in *Drosophila*, this miR was also related to morphogenesis in particular to delayed larval development (HUIMING et al., 2016).

More than a gap, the scant number of research aimed at studying the association between miR-33 and lipid metabolism using insects can be considered an expanding area. Thus, even considering *D. melanogaster* as the main model for genetic research, *T. castaneum* stands out as a growing model, especially in the study of post-transcriptional regulation of miR-mediated metabolism (RICHARDS et al., 2008; GRÜNWALD et al., 2013). This may be partly explained by the fact that miRs are more conserved in *T. castaneum* than other insects, such as *D. melanogaster*, and is therefore a more appropriate model for studying the conserved function of miRs (MARCO et al., 2010).

***Tribolium castaneum* and miR-33: interface for study of lipid metabolism**

miRs have their biogenesis initiated in the cell nucleus, where their gene transcription occurs initially by RNA polymerase II or III, generating a long single stranded RNA transcript, but only those with adequate stem length, a flexible terminal loop large (≥ 10 bp) and the ability to produce 5' and 3' single stranded RNA projections will be efficiently processed and mature into primary miRNA (pri-miRNA) containing 5' cap and poly (A) tail (LEE et al, 2004; MACFARLANE; MURPHY, 2010). Still in the nucleus, this pri-miRNA is processed and has its hairpin structure cleaved by RNase III, known as Drosha, with the aid of its DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) cofactor, forming the pre-miRNA with approximately 70 nucleotides (LEE et al, 2003).

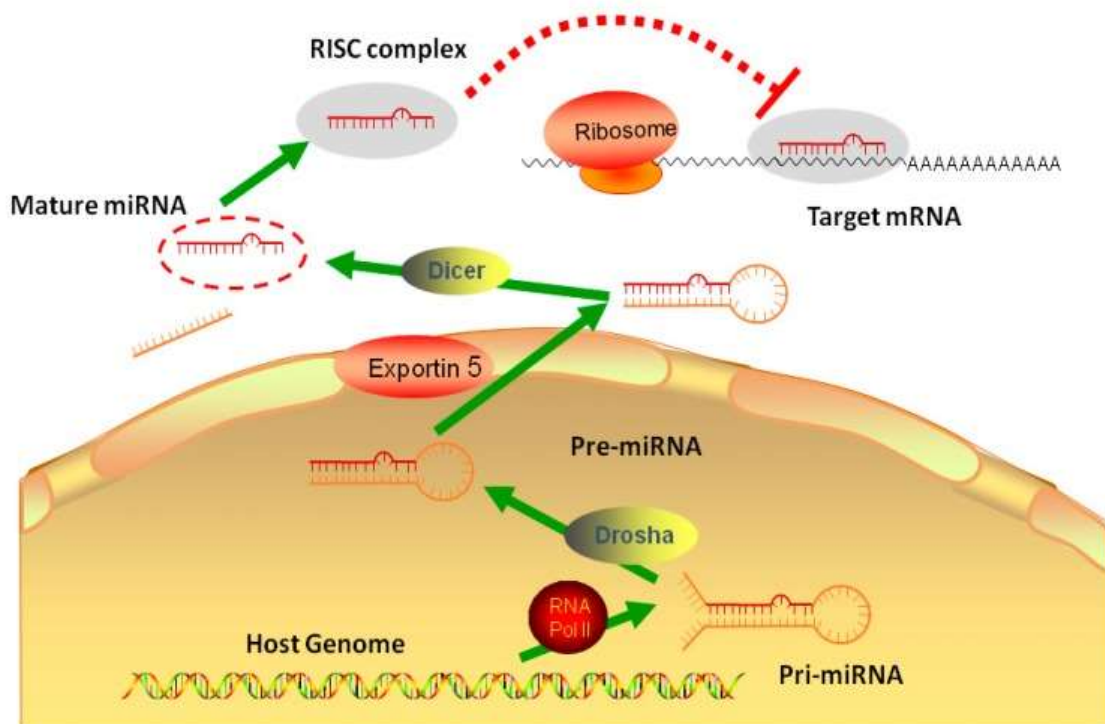
This pre-miRNA is then carried by exportin-5 (Exp5), a nuclear export protein that uses Ran-GTP as a cofactor, for the cytoplasm (LUND et al, 2004). In the cytoplasm, the pre-miRNA is processed by RNase III, Dicer, generating a double strand miR of approximately 22 nucleotides. This miR is added to an RNA-induced silence complex (RISC), which includes the Argonats 2 (AGO 2) proteins as its main components. Only one of the miR duplex strands remains in the RISC complex, thus forming the mature miR that will control post-transcriptional

expression of target genes, as shown in Figure 5.3 (SCHWARZ et al, 2003; RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

The complex formed between mature miR and RISC can act directly on gene targets, where they bind the untranslated 3' region (UTR) of target miRs. Recognition of mRNA is conditional on the base pairing between seed and miR, and the degree and nature of the sites of this pairing are crucial for the realization of this gene silencing mechanism (MACFARLANE; MURPHY, 2010).

In the silencing process, miR binds to mRNA and downregulates its expression. Although such a mechanism is not yet fully elucidated, it is known that a single miRNA can regulate on average approximately 200 target mRNAs, with totally different functions. Given this complex regulatory network of gene expression, the potential of these molecules to interfere in the development of various pathological processes is undeniable (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006; BRENNECKE et al, 2005). Target silencing, however, is the primary mechanism of miRs acting in mammals because base complementarity binding occurs imperfectly (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006; BRENNECKE et al, 2005; MACFARLANE; MURPHY, 2010).

Figure 5.3. Biogenesis scheme of the miRNAs initiated in the nucleus and terminated in the cellular cytoplasm



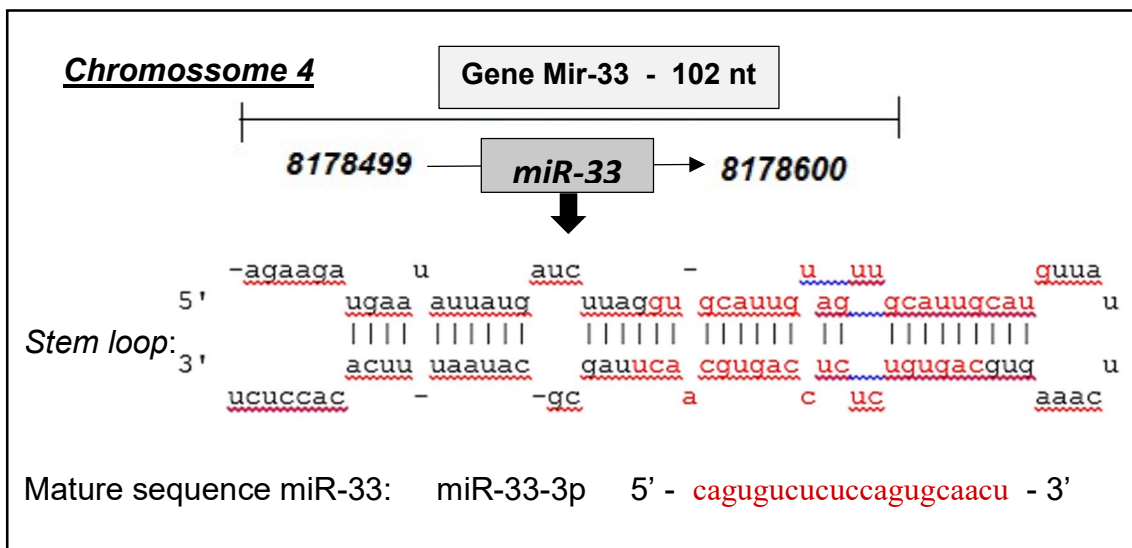
Author: YU et al., 2019.

Although there are no functional studies with miR-33 in *T. castaneum*, its sequences, precursor and mature (5' and 3'), are available from GenBank (miR-33 ID: NR_036285, Mir-33 gene ID: 100314345) and miRBase (tca-mir-33: MI0008905, tca-mir-33- 5p: MIMAT0008363 and tca-mir-33-3p: MIMAT0019107) (SINGH; NAGARAJU, 2008; MARCO et al., 2010). In this insect, the Mir-33 gene, located on chromosome 4, is responsible for the transcription of miR-33, approximately 102 nucleotides, with stem loop precursor structure, as shown in Figure 5.4.

The mature sequence of a miR originates from the 5' or 3' arm of the precursor stem loop structure. In *Drosophila melanogaster*, most identified miRs have dominance in the 5' arm use, while in *T. castaneum* there is a balanced use between the 5' and 3' arms (MARCO et al, 2010). Such differences may indicate evolutionary changes of some miRs in the process of producing the mature sequence by the dominant arm. An example of this evolutionary change in dominant arm preference in insects is miR-33, which in *T. castaneum* (MARCO et al, 2010) and *B. mori* (JAGADEESWARAN et al., 2010) has the mature sequence produced from arm 3' while in *D. melanogaster*, the dominant arm is the 5' (MARCO et al, 2010).

In order to propose *Tribolium castaneum* as an alternative model to study the post-transcriptional interaction between miR-33 and lipid metabolism, we can initially state that the mature sequence of miR-33 in this insect (tca-mir-33-3p) presents a similarity relationship with miR-33a in *Homo sapiens* (Figure 5.1A). Thus, the next step is to identify in the *T. castaneum* genome the miR-33 target genes already related to lipid metabolism.

Figure 5.4. Prediction of miR-33 transcription in *Tribolium castaneum* from the Mir-33 gene, the stem-loop sequence of this miR and its mature sequence, obtained from GenBank.



Knowing that miR-33's main mechanism of action is by down-regulation of target genes, there is a growing interest in knowing these targets. For this, we searched the Web of Science and PubMed databases to identify such target genes in humans, both by functional studies and by prediction using Bioinformatics tools. Functional studies have identified ABCA1, ABCG1, CROT, HADHB, NPC1 and ZEB1 as miR-33 target genes in *Homo sapiens* related to lipid metabolism. A Bioinformatics study analyzed three target prediction programs, TargetScan, Pictar and miRanda, yielding a total of 12 target genes: SIRT6, IRS2, SNF1K, CPT1A, PRKAA1, HMGCR, MIRPS25 and CS, as well as ABCA1, CROT, HADHB and NPC1, already identified by functional studies (ROTTIERS et al., 2011).

Given that there is no database for miR target genes in *T. castaneum*, but the miR-33 target genes in humans are known (Table 3S), we searched for similar genes in the NCBI database, through the option “genes with similar protein architecture”. The similar gene group is characterized by the set of eukaryotic genes from the NCBI database and is selected by a combination of calculated orthology and similarity of protein architectures that are defined by the NCBI SPARCLE feature, with sequential arrangement of Domain Databases Preserved (CDD) along a protein sequence, a process already performed and described previously (DIE, et al., 2019). By this means, six genes similar to the miR-33 targets were identified in *T. castaneum* (Table 8).

Table 8. miR-33 target genes in *Homo sapiens* and similar genes in *Tribolium castaneum*

miR-33 target gene in <i>Homo sapiens</i>	GENE ID	miR-33 similar target gene in <i>Tribolium castaneum</i>	GENE ID	Function
ABCG1 - ATP binding cassette subfamily G member 1	9619	W ABC transmembrane transporter white	641598	Cholesterol transport
ZEB1 - zinc finger E-box binding homeobox 1	6935	LOC100141776 zinc finger protein 1	100141776	Cholesterol Homeostasis
HADHB – hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta	3032	LOC664130 trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	664130	Fatty acid oxidation
		LOC656773 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	656773	
CROT – carnitine O-octanoyltransferase	54677	LOC659316 carnitine O-acetyltransferase	659316	Fatty acid oxidation
		LOC664403 choline O-acetyltransferase	664403	
		LOC660089 carnitine O-	660089	

		palmitoyltransferase 2, mitochondrial		
IRS2 – insulin receptor substrate 2	8660	LOC103313904 insulin receptor substrate 1	1033139 04	Insulin Signaling
CPT1A – carnitine palmitoyltransferase 1 ^a	137	LOC657643 carnitine O- palmitoyltransferase 1, liver isoform	657643	Fatty acid transport and mitochondrial oxidation
		LOC659316 carnitine O-acetyltransferase	659316	
		LOC664403 choline O-acetyltransferase	664403	
		LOC660089 carnitine O- palmitoyltransferase 2, mitochondrial	660089	

Fonte: Os autores, 2020.

In addition to functional studies, there is a desire for new therapies to combat Metabolic Syndrome, with the possibility of inhibiting key miR in organic regulation. Of particular note here is the biotechnological product claimed by WO2012027704-A1 (2012), entitled "Treating a metabolic syndrome comprising administering a microRNA-33 inhibitor to the subject" (Derwent Access: 2012-C76717), to a pharmaceutical formulation containing the miR-33 inhibitor useful in treating Metabolic Syndrome in an individual. Thus, besides helping the pathophysiological understanding of this condition, the study of miR-33 also appears as a therapeutic promise.

In this sense, *Tribolium castaneum* also appears as an alternative model for interference RNA (RNAi) studies, due to its ease of manipulation (SUSAN et al., 2009) and RNAi silencing techniques, being a relatively easy and reliable method low cost in the analysis of phenotypes due to loss of function (TOMOYASU; DENELL, 2004), in addition to presenting systemic effects that allow gene silencing in specific tissues and developmental stages by double-stranded RNA (dsRNA) injection (RICHARDS et al. , 2008).

T. castaneum larvae already had the coding gene for acyl-CoA-6 binding proteins (ACBP6) 95% silenced (BATALHA; GOLDIN; GRILLO, 2019), as well as the coding gene for Fatty Acid Carrier Protein (FATP), where 90% silencing was obtained (FREIRE; GOLDIN; GRILLO, 2018), both through dsRNA injection.

7.4 Conclusion

Since the discovery of miRs through invertebrates, great progress has been made in identifying new miRs and their gene targets. However, functional studies are incipient with the use of alternative models, especially in insects.

Thus, considering the emerging need for replacement of vertebrate models, and seeing favorable characteristics of the Insecta class, such as low maintenance costs, acceptable ethical aspects and highly reproducible biotechnological results in humans, insects appear as important models, with emphasis on *Tribolium castaneum*, a pest insect on the rise in the study of miRs, as they are more conserved in this species than in other insects.

The results found in this Bioinformatics study make it possible to infer that the mature sequence of miR-33 in *Tribolium castaneum*, produced from the 3' arm (tca-mir-33-3p), has a high degree of homology with miR-33a in humans, it is therefore an alternative, low-cost model for studies of the interaction between miR-33 and lipid metabolism, more specifically on the negative regulation of this miR on cholesterol metabolism and transport (ABCG1), cholesterol homeostasis (ZEB1), fatty acid oxidation (HADHB and CROT), fatty acid transport and mitochondrial oxidation (CPT1A), in addition to the mechanisms associated with insulin signaling (IRS2).

In addition to functional studies, new therapeutic approaches have emerged based on silencing miR-33 and its target genes, highlighting, through bioinformatics tools, *Tribolium castaneum* as an alternative model to vertebrates in the study of lipid metabolism, with results that may be mimicked in humans.

References

ADAMS, M. D., et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**. v. 287, p. 2185-95, 2000.

BATALHA, M.M.C.; GONDIM, K.C.; GRILLO, L.A.M.. **Estudo da expressão gênica de proteínas ligadoras de acil-coenzima A no inseto *Tribolium castaneum***. Tese de doutorado, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Alagoas – UFAL. 2019.

BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.B; COHEN, S.M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol**. 3: 85. 2005.

- BROWN, S. J.; SHIPPY, T. D.; MILLER, S.; BOLOGNESI, R.; BEEMAN, R.W. et al. The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): a model for studies of development and pest biology. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2009: pdb-emo126. 2009.
- BUSHATI, N.; COHEN, S.M. MicroRNA functions. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 23: 175-205. 2007.
- CAO, J.; TONG, C.; WU, X.; LV, J.; YANG, Z.; JIN, Y. Identification of conserved microRNAs in *Bombyx mori* (silkworm) and regulation of fibroin L chain production by microRNAs in heterologous system. **Insect biochemistry and molecular biology.** 38: 1066-1071. 2008.
- CHOWANSKI, S.; ADAMSKI, Z.; LUBAWY, J. et al. 2017. Insect Peptides - Perspectives in Human Diseases Treatment. **Curr Med Chem.** 24:3116-3152. doi: 10.2174/0929867324666170526120218.
- DÁVALOS, A.; GOEDEKE, L.; SMIBERT, P. et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS.** 108: 9232 – 9237. doi: 10.1073/pnas.1102281108. 2011.
- DEKKERS, K.F., et al. Blood lipids influence DNA methylation in circulating cells. **Genome Biol.** 17: 138. 2016.
- DEMIR, E.; DICKSON, B.J. Fruitless splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. **Cell.** 121: 785–794.
- DIE, J.V.; ELMASSRY, M.M.; LEBLANC, K.H. et al. geneHummus: an R package to define gene families and their expression in legumes and beyond. **BMC Genomics.** 20; 591. doi:10.1186/s12864-019-5952-2. 2019.
- GRÜNWARD, S.; STELLZIG, J.; ADAM, I.V. et al. Longevity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* is enhanced by broccoli and depends on nrf-2, jnk-1 and foxo-1 homologous genes. **Genes & Nutrition.** 8: 438-448. 2013.
- FREIRE, C.C.S.D.; GONDIM, K.C.; GRILLO, L.A.M. **Metabolismo de lipídeos em inseto Coleóptero: digestão e transporte de ácidos graxos.** Tese de doutorado, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Alagoas – UFAL. 2018.
- HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J Clin Invest.** 109:1125-31. doi: 10.1172/JCI15593. 2002.
- HUIMING, Y.; MENGJIE, L.; XIAOLONG, H. et al. MicroRNA-dependent roles of Drosha and Pasha in the *Drosophila* larval ovary morphogenesis. **Developmental Biology.** 416: 312 – 323. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.06.026>. 2016.
- INSUA, J.L.; LLOBET, E.; MORANTA, D. et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. **Infect Immun.** 81: 552-65. doi: 10.1128/IAI.00391-13. 2013.

JAGADEESWARAN, G.; ZHENG, Y.; SUMATHIPALA, N. et al. Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. **BMC genomics**, 11: 52. 2010.

JEFFRIES, M.A.; SAWALHA, A.H. Autoimmune disease in the epigenetic era: how has epigenetics changed our understanding of disease and how can we expect the field to evolve?. **Expert review of clinical immunology**. 11: 45-58. 2015.

LAGOS-QUINTANA M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**. 294: 853-8. 2001. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1064921>.

LAU, N.C.; LIM, L.P.; WEINSTEIN, E.G.; BARTEL, D.P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 294:, 858-862. 2001.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**. 75: 843-54. doi: [org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y). PMID:8252621. 1993.

LEE, R.C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**. 294: 862-4. PMID: 11679672. 2001.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**. 425: 415-9. 2003.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **Embo J**. 23: 4051-60. 2004.

LIN, S.L.; MILLER, J.D.; YING, S.Y. Intronic MicroRNA (miRNA). **J Biomed Biotechnol**. 2006: 1–13. doi: [10.1155/jbb/2006/26818](https://doi.org/10.1155/jbb/2006/26818). 2006.

LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J.E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**. 303: 95-8. 2004.

MACFARLANE, L.A.; MURPHY, P.R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **Curr Genomics**. 11: 537-61. 2010.

MARCO, A.; JEROME, H.L.; HUI, M.R.; SAM, G.J. Functional Shifts in Insect microRNA Evolution. **Genome Biol Evol**. 2: 686–696. doi: [10.1093/gbe/evq053](https://doi.org/10.1093/gbe/evq053). 2010.

MARQUART, T.J.; ALLEN, R.M.; ORY, D.S.; BALDÁN, A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. **Proc Natl Acad Sci USA**. 107: 12228–12232. 2010.

MOSS, E.G.; LEE, R.C.; AMBROS, V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. **Cell**, 88: 637-646. 1997.

NAJAFI-SHOUSHTARI, S.H. et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. **Science**. 328; 1566–1569. 2010.

NORATA, G.D.; SALA, F.; CATAPANO, A.L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. MicroRNAs and lipoproteins: a connection beyond atherosclerosis?. **Atherosclerosis**. 227:209–215. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.11.019. 2012.

PASQUINELLI, A.E.; REINHART, B.J.; SLACK, F.; MARTINDALE, M.Q.; KURODA, M.I.; MALLER, B. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**. 408: 86-9. doi.org/10.1038/35040556. 2000.

PESCHANSKY, V.J.; WAHLESTEDT, C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. **Epigenetics**. 9:3-12. doi: 10.4161/epi.27473. 2014.

RATCLIFFE, N.A., et al. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 41: 747–769. 2011.

RAYNER, K.J., et al. miR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. **Science**. 328: 1570–1573. 2010.

REINHART, B.J.; SLACK, F.J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A.E.; BETTINGER, J.C.; ROUGVIE, A.E.; HORVITZ, H.R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. 403: 901-6. PMID: 10706289. 2000.

RICARTE FILHO, J.C.M.; KIMURA, E.T. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and câncer. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 50: 1102-1107. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302006000600018>. 2006.

RICHARDS, S., et al. *Tribolium* genome sequencing consortium. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**. 452: 949–955. doi:10.1038/nature06784. 2008.

RIVAS, E. R-scape User's Guide. 2016. Disponível em: http://eddylab.org/software/rscape/R-scape_userguide.pdf. Acesso em: 10 jun. 2018.

ROTH, T.F.; PORTER, R.R. Yolk uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. **J. Cell. Biol.** 20: 313 - 332. 1964.

ROTTIERS, V.; NAJAFI-SHOUSHTARI, S.H.; KRISTO, F. et al. MicroRNAs in metabolism and metabolic diseases. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**. 76:225-33. doi: 10.1101/sqb.2011.76.011049. 2011.

SAKAI, T.; KITAMOTO, T. Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. **Journal of Neurobiology**. 66: 821–834. 2006.

SAKLAYEN, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Curr Hypertens Rep**. 20: 12. 2018.

- SAVARD, J.; TAUTZ, D.; LERCHER, M.J. Genome-wide acceleration of protein evolution in flies (Diptera). **BMC Evol Biol.** 6: 7. 2006.
- SCHWARZ, D.S.; HUTVÁGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, 115: 199-208. 2003.
- SINGH, J.; NAGARAJU, J. In silico prediction and characterization of microRNAs from red flour beetle (*Tribolium castaneum*). **Insect Mol Biol.** 17: 427 – 436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00816.x>. 2008.
- TELFER, W.H. The selective accumulation of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. **Biol. Bull.** 119: 338 - 346. 1960.
- TELFER, W.H. The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moths. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** 9: 747-754. 1961.
- TOMOYASU, Y.; DENELL, R.E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development Genes and Evolution.** 214: 575–578. 2004.
- WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, 75: 855-862. 1993.
- WIGHTMAN, B.; BÜRGLIN, T.R.; GATTO, J.; ARASU, P.; RUVKUN, G. Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. **Genes & development.** 5: 1813-1824. 1991.
- ZIHENG, Y. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. **Molecular Biology and Evolution**, 24: 1586–1591. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm088>. 2007.
- YOSHIKAWA, T.; SHIMANO, H.; AMEMIYA-KUDO, M. et al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. **Mol Cell Biol.** 21: 2991-3000. doi:10.1128/MCB.21.9.2991-3000.2001. 2001.
- YU, J.; PENG, J.; LUAN, Z.; ZHENG, F.; Su, W. MicroRNAs as a novel tool in the diagnosis of liver lipid dysregulation and fatty liver disease. **Molecules.** 24: 230. 2019.

Supplementary Material

Table 2S. miR precursor sequences identified in different species and made available on the miRBase base, containing the miR identification, the access code on this base and the scientific and popular name of the species.

	<i>Identification</i>	<i>Access Code</i>	<i>Organism (scientific name / popular name)</i>
1.	cte-mir-33	MI0010096	<i>Capitella teleta</i> (worm)
2.	mmu-mir-33	MI0000707	<i>Mus musculus</i> (rat)

3.	nvi-mir-33	MI0014718	<i>Nasonia vitripennis</i> (wasp)
4.	cqu-mir-33	MI0013620	<i>Culex quinquefasciatus</i> (mosquito)
5.	sko-mir-33	MI0010153	<i>Saccoglossus kowalevskii</i> (acorn worm)
6.	lva-mir-33	MI0025143	<i>Lytechinus variegatus</i> (sea urchin)
7.	dps-mir-33	MI0001316	<i>Drosophila pseudoobscura</i> (fruit fly)
8.	dya-mir-33	MI0009636	<i>Drosophila yakuba</i> (African fruitfly)
9.	cgr-mir-33	MI0020497	<i>Cricetulus griseus</i> (chinese hamster)
10.	mne-mir-33	MI0002688	<i>Macaca nemestrina</i> (southern pig-tailed macaque)
11.	dpe-mir-33	MI0009299	<i>Drosophila persimilis</i> (fruit fly)
12.	tca-mir-33	MI0008905	<i>Tribolium castaneum</i> (brown flour beetle)
13.	pca-mir-33	MI0037580	<i>Polistes canadensis</i> (red paper wasp)
14.	efu-mir-33	MI0028606	<i>Eptesicus fuscus</i> (bat)
15.	ame-mir-33	MI0005738	<i>Apis mellifera</i> (Bee-European)
16.	dvi-mir-33	MI0009507	<i>Drosophila virilis</i> (fruit fly)
17.	dpu-mir-33	MI0012243	<i>Daphnia pulex</i> (water flea)
18.	ppy-mir-33	MI0035016	<i>Pundamilia nyererei</i> (fish)
19.	dan-mir-33	MI0008998	<i>Drosophila ananassae</i> (fruit fly)
20.	dwi-mir-33	MI0009614	<i>Drosophila willistoni</i> (fruit fly)
21.	aae-mir-33	MI0013493	<i>Aedes aegypti</i> (dengue mosquito)
22.	dse-mir-33	MI0009364	<i>Drosophila sechellia</i> (fruit fly)
23.	dqu-mir-33	MI0037482	<i>Dinoponera quadriceps</i> (ant)
24.	dmo-mir-33	MI0009249	<i>Drosophila mojavensis</i> (fruit fly)
25.	ola-mir-33	MI0019456	<i>Oryzias latipes</i> (rice fish)
26.	rno-mir-33	MI0000874	<i>Rattus norvegicus</i> (mouse-brown)
27.	mdo-mir-33	MI0012511	<i>Monodelphis domestica</i> (gray possum)
28.	dsi-mir-33	MI0009431	<i>Drosophila simulans</i> (fruit fly)
29.	der-mir-33	MI0009086	<i>Drosophila erecta</i> (fruit fly)
30.	lgi-mir-33	MI0010110	<i>Lottia gigantea</i> (sea snail)
31.	dme-mir-33	MI0000364	<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)
32.	tgu-mir-33	MI0013752	<i>Taeniopygia guttata</i> (mandarin)
33.	cin-mir-33	MI0007157	<i>Ciona intestinalis</i>
34.	mse-mir-33	MI0020978	<i>Manduca sexta</i> (mot)
35.	spu-mir-33	MI0010194	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (sea urchin)
36.	cja-mir-33	MI0031937	<i>Callithrix jacchus</i> (sonhim/white tufted pigeon)
37.	dgr-mir-33	MI0009149	<i>Drosophila grimshawi</i> (fruit fly)
38.	aga-mir-33	MI0033352	<i>Anopheles gambiae</i> (mosquito)
39.	ppa-mir-33	MI0002689	<i>Pan paniscus</i> (pygmy chimp)
40.	bmo-mir-33	MI0012293	<i>Bombyx mori</i> (silkworm)
41.	ggo-mir-33	MI0002686	<i>Gorilla gorilla</i> (gorilla)
42.	tcf-mir-33	MI0033200	<i>Triops cancriformis</i> (tadpole shrimp)
43.	mle-mir-33	MI0039550	<i>Melibe leonina</i> (hooded nudibranch, lion nudibranch)

44.	cfa-mir-33a	MI0007988	<i>Canis familiaris</i> (dog)
45.	ppy-mir-33a	MI0002687	<i>Pongo pygmaeus</i> (orangutan-of-borneo)
46.	hsa-mir-33a	MI0000091	<i>Homo sapiens</i> (human)
47.	ptr-mir-33a	MI0002685	<i>Pan troglodytes</i> (robust chimpanzee)
48.	mml-mir-33a	MI0002684	<i>Macaca mulatta</i> (monkey-rhesus)
49.	ssa-mir-33a-1	MI0026690	<i>Salmo salar</i> (salmon)
50.	ocu-mir-33a	MI0039255	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (European rabbit)
51.	xla-mir-33a	MI0038323	<i>Xenopus laevis</i> (African Toad Frog)
52.	oni-mir-33a	MI0034762	<i>Oreochromis niloticus</i> (Nile tilapia)
53.	eca-mir-33a	MI0012935	<i>Equus caballus</i> (horse)
54.	xtr-mir-33a	MI0004922	<i>Xenopus tropicalis</i> (frog)
55.	nbr-mir-33a	MI0034503	<i>Neolamprologus brichardi</i> (fish)
56.	pal-mir-33a	MI0032484	<i>Pteropus alecto</i> (flying fox)
57.	chi-mir-33a	MI0030749	<i>Capra hircus</i> (goat)
58.	pma-mir-33a	MI0017048	<i>Petromyzon marinus</i> (vampire fish)
59.	dno-mir-33a	MI0038942	<i>Dasypus novemcinctus</i> (chicken-armadillo)
60.	oan-mir-33a	MI0006674	<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (platypus)
61.	mze-mir-33a	MI0034242	<i>Metriaclima zebra</i> (fish)
62.	tch-mir-33a	MI0031127	<i>Tupaia chinensis</i>
63.	oha-mir-33a	MI0031459	<i>Ophiophagus hannah</i> (snake)
64.	bta-mir-33a	MI0009807	<i>Bos taurus</i> (Cattle)
65.	cpo-mir-33a	MI0038598	<i>Cavia porcellus</i> (Guinea pig)
66.	gmo-mir-33b-1	MI0036074	<i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod)
67.	ssc-mir-33b	MI0036557	<i>Sus scrofa</i> (boar)
68.	gga-mir-33-1	MI0001170	<i>Gallus gallus</i> (rooster-banquiva)
69.	bbe-mir-33-1	MI0026234	<i>Branchiostoma belcheri</i> (lancet fish)
70.	hme-mir-33-1	MI0021775	<i>Heliconius melpomene</i> (butterfly postman)
71.	bfl-mir-33-1	MI0010525	<i>Branchiostoma floridae</i>
72.	aca-mir-33-1	MI0018854	<i>Anolis carolinensis</i> (lizard)
73.	cli-mir-33-1	MI0029937	<i>Columba livia</i> (pigeon)
74.	cpi-mir-33-1	MI0029432	<i>Chrysemys picta</i> (painted turtle)
75.	ami-mir-33-1	MI0029698	<i>Alligator mississippiensis</i> (north american alligator)
76.	abu-mir-33-1	MI0033953	<i>Astatotilapia burtoni</i> (fish)
77.	pbv-mir-33-1	MI0030191	<i>Python bivittatus</i> (python snake)

Fonte: Os autores, 2020.

Table 3S. Experimental studies with miR-33 (a / b / *) extracted from Web of Science and PubMed databases, highlighting the model used and the identified target genes.

miR-33	Experimental Model	Target Genes	Reference
miR-33	chicken	CROT	Shao, F.; Wang, X.; Yu, J.; et al. 2019
		HADHB	
miR-33	chicken	SREBF1	Hicks, Julie A.; Porter, Tom E.; Sunny, Nishanth E.; et al. 2019

miR-33	murine model	ABCA1	Baba, Osamu; Horie, Takahiro; Nakao, Tetsushi; et al. 2018
		HMGA2	
miR-33	human	—	Reddy, Lakshmi Lavanya; Shah, Swarup A. V.; Ponde, Chandrashekhar K.; et al. 2019
miR-33a/b	human	—	Deng, Xujing; Qin, Shanshan; Chen, Yuqi; et al. 2018
miR-33	human	—	Liu, Xiaoran; Garban, Josephine; Jones, Peter J.; et al. 2018
miR-33	human	—	Ma, Elizabeth; Fu, Yuchang; Garvey, W. Timothy. 2018
miR-33b	human	ABCA1	Yang, Shuli; Si, Lihui; Fan, Limei; et al. 2018
miR-33	murine model	HMGA2	Price, Nathan L.; Singh, Abhishek K.; Rotllan, Noemi; et al. 2018
miR-33	human	—	Xie, Zezhou; Ma, Peipei. 2018
miR-33	murine model	ABCA1	Sun, Yan; Zhang, Dai; Liu, Xiaoli; et al. 2018
		CHOP	
miR-33	murine model	ABCA1	Ren, Kun; Jiang, Ting; Zhou, Hui-Fang; et al. 2018
miR-33	murine model	—	Ghareghani, Parvin; Shanaki, Mehrnoosh; Ahmadi, Saeideh; et al. 2018
miR-33	murine model	AMPK	Mohammadi, A.; Fallah, H.; Shahouzehi, B.; et al. 2018
		SIT1	
miR-33	murine model	CYP7A1	Liu, Suwen; Wu, Zhanyi; Guo, Shuo; et al. 2018
miR-33	murine model	ABCA1	Mohammadi, Abbas; Fallah, Hossein; Shahouzehi, Beydolah; et al. 2017
miR-33	murine model	ABCA1	Price, Nathan L.; Rotllan, Noemi; Canfran-Duque, Alberto; et al. 2017
		ABCG1	
miR-33	murine model	MAFB	Kim, Hwijin. 2017
miR-33a/b	human	ZEB1	D'Agostino, Marco; Martino, Francesco; Sileno, Sara; et al. 2017
miR-33	grass carp (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	—	Wang, Jun-li; Lu, Rong-hua; Sun, Jun-jun; et al. 2017
miR-33	murine model	FOXO3; TFEB; ABCA1	Ouimet, Mireille; Ediriweera, Hasini; Afonso, Milessa Silva; et al. 2017
miR-33	murine model	SIRT6; ABCA1; ABCG1	He, Jiangping; Zhang, Guangya; Pang, Qi; et al. 2017
miR-33	murine model	IRS1; ApoB; ChREBP	Sud, Neetu; Zhang, Hanyuan; Pan, Kaichao; et al. 2017
miR-33	Human / murine model	—	Nishiga, Masataka; Horie, Takahiro; Kuwabara, Yasuhide; et al. 2017
miR-33	murine model	CPT1A; SIRT1	Zhang, Zhiying; Liu, Huifang; Li, Qiang. 2017
miR-33	in vitro / murine model	IRS2	Tang, Chen-Yi; Man, Xiao-Fei; Guo, Yue; et al. 2017
miR-33	murine model	ABCA1; CPT1a	Su, Dongxiao; Zhang, Ruifen; Hou, Fangli; et al. 2017

miR-33	murine model	ABCA1	Nakao, Tetsushi; Horie, Takahiro; Baba, Osamu; et al. 2017
miR-33	murine model	—	Wang, Hualin; Shao, Yang; Yuan, Fahu; et al. 2017
miR-33a	human	—	Dong, Jing; Liang, Ying-Zhi; Zhang, Jie; et al. 2017
miR-33	rabbitfish (<i>Siganus canaliculatus</i>)	INSIG1; ABCA1;	Zhang, Qinghao; You, Cuihong; Wang, Shuqi; et al. 2016
miR-33	murine model	ABCA1 / ABCG1	Lai, Lihua; Azzam, Kathleen M.; Lin, Wan-Chi; et al. 2016
miR-33	murine model	AMPK α	Tumurkhuu, Gantsetseg; Shimada, Kenichi; Dagvadorj, Jargalsaikhan; et al. 2016
miR-33a	human	ABCA1; ABCG1; CROT; HADHB	Vega-Badillo, Joel; Gutierrez-Vidal, Roxana; Hernandez-Perez, Hugo A.; et al. 2016
miR-33	murine model	—	Castoldi, Mirco; Kordes, Claus; Sawitza, Iris; et al. 2016
miR-33	human	—	Can, U.; Buyukinan, M.; Yerlikaya, F. H. 2016
miR-33a	human	ABCA1	Chen, Wei-Ming; Sheu, Wayne H-H; Tseng, Pei-Chi; et al. 2016
miR-33a/b	murine model / no-human primates (monkey)	<i>OSBPL6</i>	Ouimet, Mireille; Hennessy, Elizabeth J.; van Solingen, Coen; et al. 2016
miR-33a/b	human	—	Martino, Francesco; Carlomosti, Fabrizio; Avitabile, Daniele; et al. 2015
miR-33a/b	human	—	Zambrano, Tomas; Hirata, Rosario D. C.; Hirata, Mario H.; et al. 2015
miR-33	murine model	Abca1; Hadhb; Cpt1 α	Karunakaran, Denuja; Richards, Laura; Geoffrion, Michele; et al. 2015
miR-33	murine model	ABCA1	Ouimet, Mireille; Ediriweera, Hasini N.; Gundra, U. Mahesh; et al. 2015
miR-33	murine model	ABCA1	Kim, Jaekwang; Yoon, Hyejin; Horie, Takahiro; et al. 2015
miR-33	human / murine model	PPAR γ -1 α ; PGC-1 α ; SLC25A25; PDK4 (mitochondrial)	Karunakaran, Denuja; Thrush, A. Brianne; My-Anh Nguyen; et al. 2015
miR-33	Landes geese	ABCA1; ABCG1; NPC1; CROT; HADHB; ADRP; IRS2; GPT2; AMPK α 1	Zheng, Yun; Jiang, Shibe; Zhang, Yihui; et al. 2015
miR-33	murine model	Abca1; Cpt1 α ; Hadhb	Tarling, Elizabeth J.; Ahn, Hannah; Vallim, Thomas Q. de Aguiar. 2015
miR-33	murine model	—	Baselga-Escudero, Laura; Pascual-Serrano, Aida; Ribas-Latre, Aleix; et al. 2015
miR-33	murine model	ABCA1; ApoA1;	Kostopoulou, Fotini; Malizos, Konstantinos N.; Papatheanasiou, Ioanna; et al. 2015
miR-33b	human	ABCA1; ABCG1	Mandolini, C.; Santovito, D.; Marcantonio, P.; et al. 2015

miR-33	murine model	NFYC	Goedeke, Leigh; Salerno, Alessandro; Ramirez, Cristina M.; et al. 2014
miR-33	In vitro (<i>Chlamydia pneumoniae</i>)	ABCA1	Zhao, Guo-jun; Mo, Zhong-Cheng; Tang, Shi-Lin; et al. 2014
miR-33	murine model	IRS2	Bae, Cho-Rong; Hasegawa, Kazuya; Akieda-Asai, Sayaka; et al. 2014
miR-33	murine model	NSF	Allen, Ryan M.; Marquart, Tyler J.; Jesse, Jordan J.; et al. 2014
miR-33b	murine model	—	Horie, Takahiro; Nishino, Tomohiro; Baba, Osamu; et al. 2014
miR-33	chicken	FTO	Shao, Fang; Wang, Xingguo; Yu, Jianfeng; et al. 2014
miR-33a	human	ABCA1, ABCG1	Wang, Jian-Min; Zhou, Jia-Jun; Zheng, Qian; et al. 2014
miR-33a/b	human	—	Cao, Ruihua; Bai, Yongyi; Sun, Lan; et al. 2014
miR-33a	human / murine model	ABCA1	Baselga-Escudero, Laura; Blade, Cinta; Ribas-Latre, Aleix; et al. 2014
miR-33	murine model	SREBP-1 SREBP-2	Horie, Takahiro; Nishino, Tomohiro; Baba, Osamu; et al. 2013
miR-33a/b	no-human primates (African green monkey) / murine model	CROT; PRKAA1; ABCA1;	Rottiers, Veerle; Obad, Susanna; Petri, Andreas; et al. 2013
miR-33	murine model	ABCA1	Zhao, Guo-Jun; Tang, Shi-Lin; Lv, Yun-Cheng; et al. 2013
miR-33a	murine model	SREBP-2	Li, Tiangang; Francl, Jessica M.; Boehme, Shannon; et al. 2013
miR-33	murine model	ABCA1; CPT1A; IRS2; AMPK; CROT; HADHB	Rotllan, Noemi; Ramirez, Cristina M.; Aryal, Binod; et al. 2013
miR-33a	murine model	ABCA1; SREBP2; CPT1A	Baselga-Escudero, Laura; Arola-Arnal, Anna; Pascual-Serrano, Aida; et al. 2013
miR-33	murine model	SREBP-2	Jeon, Tae-II; Esquejo, Ryan M.; Roqueta-Rivera, Manuel; et al. 2013
miR-33* miR-33a miR-33b*	Human / No-human primate / murine model	miR-33*: Npc1, Crot, Irs2, Src1, Src3, Nfyc, Rip140 miR-33a: Ampka, Cpt1a miR-33b*: Nfyc, Rip140	Goedeke, Leigh; Vales-Lara, Frances M.; Fenstermaker, Michael; et al. 2013
miR-33	murine model	ABCA1, SREBP2, ABCG1	Sene, Abdoulaye; Khan, Aslam A.; Cox, Douglas; et al. 2013
miR-33	murine model	ABCA1, CPT1 α , ABCB11	Marquart, Tyler J.; Wu, Judy; Lusic, Aldons J.; et al. 2013
miR-33	murine model	ABCA1; CROT; CPT1	Horie, Takahiro; Baba, Osamu; Kuwabara, Yasuhide; et al. 2012
miR-33	murine model	—	Baselga-Escudero, Laura; Blade, Cinta; Ribas-Latre, Aleix; et al. 2012
miR-33	murine model	ABCA1; ABCA11; ATP8B1	Allen, Ryan M.; Marquart, Tyler J.; Albert, Carolyn J.; et al. 2012

miR-33a/b	No-human primate	CROT; CPT1A; HADHB; PRKAA1; SREBF1; FASN; ACLY	Rayner, Katey J.; Esau, Christine C.; Hussain, Farah N.; et al. 2011
miR-33	murine model	ACBA1; ABCG1; CPT1A; CROT; HADHB; INSIG1; HMGCR; SREBF2	Rayner, Katey J.; Sheedy, Frederick J.; Esau, Christine C.; et al. 2011
miR-33	murine model	ABCA1; ABCG1	Ho, Ping-Chih; Chang, Kun-Che; Chuang, Ya-Shan; et al. 2011
miR-33	murine model	ABCA1; HADHB; CROT; ATP8B1; CPT1A	Gerin, Isabelle; Clerbaux, Laure-Alix; Haumont, Olivier; et al. 2010
miR-33	murine model	ABCA1	Horie, Takahiro; Ono, Koh; Horiguchi, Masahito; et al. 2010
miR-33	murine model	ABCA1; ABCG1	Marquart, Tyler J.; Allen, Ryan M.; Ory, Daniel S.; et al. 2010
miR-33a/b	murine model	ABCA1	Najafi-Shoushtari, S. Hani; Kristo, Fjoralba; Li, Yingxia; et al. 2010
miR-33	human / murine model	ABCA1; ABCG1; NPC1	Rayner, Katey J.; Suarez, Yajaira; Davalos, Alberto; et al. 2010
miR-33	chicken	TGFB1, HOXA11; GTAM	Hicks, Julie A.; Trakooljul, Nares; Liu, Hsiao-Ching. 2010
miR-33 miR-33*	<i>In vitro</i>	AMPK	Mireille Ouimet, Stefan Koster, Erik Sakowski, et al. 2016
miR-33-5p	human	ABCA1	Zhao L , Huang J, Zhu Y , Han S , Qing K , Wang J, Feng Y. 2019
miR-33	murine model	ABCA1	Price NL, Rotllan N, Zhang X, Canfrán-Duque A, Nottoli T, Suarez Y, Fernández-Hernando C. 2019
miR-33	<i>In vitro</i>	CPT1 α ácidos grasos sintase (FAS)	Dongxiao Su, Hesheng Liu, Xiangyang Qi, Lihong Dong, Ruifen Zhang & Jie Zhang. 2019
miR-33a/b	human	—	Corona-Meraz FI, Vázquez-Del Mercado M, Ortega FJ, Ruiz-Quezada SL, Guzmán-Ornelas MO, Navarro-Hernández RE. 2018
miR-33	rabbitfish	insulin-induced gene 1 (insig1)	Jun Jun Sun, Li Guo Zheng, Cui Ying Chen, Jin Ying Zhang, Cui Hong You, Qing Zhang, Hong Yu Ma, Óscar Monroig, Douglas R Tocher, Shu Qi Wang, Yuan You Li. 2019
miR-33	human	—	Lin F, Chen HW, Shi ZL, Zhao GA, Sun YX. 2017.
miR-33a/b	murine model	—	Koyama, S., Horie, T., Nishino, T., Baba, O., Sowa, N., Miyasaka, Y., Nakashima, Y., et al. 2019
miR-33a/b	<i>In vitro</i>	—	Tomás Zambrano, Rosario D.C. Hirata, Mario H. Hirata, Álvaro Cerda, Luis A. Salazar. 2015
miR-33	murine model	—	Nguyen MA, Wyatt H, Susser L, Geoffrion M, Rasheed A, Duchez AC, Cottee ML, Afolayan E, Farah

			E, Kahiel Z, Côté M, Gadde S, Rayner KJ. 2019.
miR-33	<i>In vitro</i>		<u>Liu S, Sui Q, Zhao Y, Chang X.</u> 2019
miR-33a/b	<i>Drosophila</i>	CPT1a	Alberto Dávalos, Leigh Goedeke, Peter Smibert, Cristina M. Ramírez, Nikhil P. Warriar, Carlos Fernández-Hernando, et al. 2011.

Fonte: Os autores, 2020.

8 Conclusões

Conclusões

A inflexibilidade metabólica induzida pela dieta hiperlipídica causou alterações bioquímicas, estruturais e metabólicas semelhantes à Síndrome Metabólica nas larvas de *T. castaneum*, provando que esse inseto pode ser utilizado para estudos de distúrbios do metabolismo lipídico;

Alterações causadas pela inflexibilidade metabólica causaram maior geração de EROs, com conseqüente aumento da respiração mitocondrial (complexo II), provavelmente de forma compensatória, para reduzir o estresse metabólico causado pela lipotoxicidade;

A suplementação com fenofibrato atuou para manter a homeostase por duas formas: indiretamente, estimulando a lipólise e mitigando as alterações observadas na síndrome metabólica; ou diretamente, através de mecanismos que regulam a atividade mitocondrial. Esse resultado também comprova o uso de *T. castaneum* para estudar os efeitos terapêuticos (ou não) dos medicamentos;

T. castaneum conservou sequências e genes-alvo semelhantes ao miR-33 em humanos, sendo um modelo importante no estudo do metabolismo e transporte do colesterol (ABCG1), homeostase do colesterol (ZEB1), oxidação de ácidos graxos (HADHB e CROT), transporte de ácidos graxos e oxidação mitocondrial (CPT1A) e mecanismos associados à sinalização de insulina (IRS2);

Em comparação a outros insetos, como *Drosophila melanogaster*, *T. castaneum* é mais apropriado para estudar a função conservada dos miRs, pois suas seqüências são evolutivamente mais conservadas;

Assim, afirma-se sobre as vantagens da aplicação biotecnológica do inseto *Tribolium castaneum* como modelo alternativo de baixo custo e alto desempenho em estudos do metabolismo lipídico, com foco na regulação pelo miR-33 e na bioenergética mitocondrial.

A tais resultados experimentais, soma-se o fato de que, nas buscas por patentes e artigos, não se encontrou registros de um método de utilização deste inseto como modelo alternativo, assim, a prospecção tecnológica realizada embasa a necessidade de proteção biotecnológica para este método de baixo custo, alta eficácia e inovador.

Apêndices

Apêndice A – Publicação da prospecção tecnológica:

Tribolium castaneum como modelo experimental para estudos em metabolismo de carboidratos e lipídeos: uma prospecção tecnológica.

Revista: Caderno de Prospecção v. 13, n. 5 (2020)

CADERNOS DE PROSPECÇÃO

CAPA SOBRE PÁGINA DO USUÁRIO PESQUISA ATUAL
ANTERIORES NOTÍCIAS PROSPECT&I ENAPID 2019 PROFNIT

[Capa](#) > [Usuário](#) > [Autor](#) > [Arquivar](#)

ARQUIVAR

ATIVO ARQUIVO

ID	MM-DD ENVIADO	SEÇÃO	AUTORES	TÍTULO	ACESSOS	SITUAÇÃO
29666	02-22	PROSP	Silva, Batalha, Dornelas, Grillo	TRIBOLIUM CASTANEUM COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDOS...	57	v. 13, n. 5 (2020)

1 a 1 de 1 itens

INICIAR NOVA SUBMISSÃO

[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de submissão.

APONTAMENTOS

TODOS NOVO PUBLICADO IGNORADO

	DATA DE INCLUSÃO	HITS	URL	ARTIGO
<input type="checkbox"/>	2020-10-06	44	https://scholar.google.com.br/	Tribolium castaneum como modelo experimental para estudos em metabolismo de...

OPEN JOURNAL
SYSTEMS

[Ajuda do sistema](#)

USUÁRIO

Logado como:
meirielly
[Meus periódicos](#)
[Perfil](#)
[Sair do sistema](#)

AUTOR

[Submissões](#)
[Ativo \(0\)](#)
[Arquivo \(1\)](#)
[Nova submissão](#)

CONTEÚDO DA
REVISTA

Pesquisa

Escopo da Busca

Todos

Procurar

[Por Edição](#)
[Por Autor](#)
[Por título](#)
[Outras revistas](#)

INFORMAÇÕES

Apêndice B – Protocolo do depósito da patente no INPI



11/05/2020 870200057894
13:51
29409161918631491

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 009276 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Método de preparação do inseto *Tribolium castaneum* (Coleóptero: Tenebrionidae) como modelo de baixo custo para estudo da Síndrome Metabólica

Resumo: Diante do drástico aumento das doenças crônicas não transmissíveis, em especial a Síndrome Metabólica, é necessário que se avance em pesquisas que possibilitem analisar alterações histológicas, funcionais, bioquímicas e morfológicas desta disfunção em animais, que possam ser reproduzíveis em seres humanos, assim como o estudo de novos fármacos candidatos em seu tratamento. Os principais modelos utilizados são os vertebrados, em especial o murino (ratos e camundongos), porém, os relevantes aspectos éticos e elevados custos, torna emergente a necessidade de modelos alternativos. Nesse contexto, destacam-se os insetos e, especificamente, o *Tribolium castaneum* (Coleóptero: Tenebrionidae), modelo em destaque nos estudos metabólicos, genéticos, bioquímicos e outros. Assim, a presente invenção remete à aquisição de um novo método de preparação de insetos *T. castaneum*, como modelo de baixo custo e alta eficácia, para estudo da Síndrome Metabólica e do efeito de fármacos candidatos nesta disfunção. Para isto, a metodologia propõe um método para induzir insetos à condição análoga à Síndrome Metabólica e a suplementação com fármacos, a fim de se analisar seus efeitos. Tais alterações podem ser avaliadas por meios das técnicas investigativas descritas, como bioquímicas e de biologia molecular. A implementação deste novo método proporciona resultados mais rápidos, baratos, confiáveis, reproduzíveis, com aplicação diversificada e que promove maior diferenciação e fortalecimento da biotecnologia brasileira, já que emprega um inseto praga como modelo experimental, de maneira sustentável e eficaz.

Figura a publicar: 01

Apêndice C – Comprovante de submissão do Artigo: miR-33 and lipid metabolism: focus on insects as a model

Revista: Acta Biológica Colombiana

The screenshot shows the 'bdigital' portal interface. At the top, there is a navigation bar with the university logo and the URL 'revistas.unal.edu.co'. Below this, a blue header contains the 'bdigital' logo and navigation links: 'Inicio', 'Buscar', 'Número actual', 'Números anteriores', and 'Acercas de'. On the left side, there is a sidebar with a user profile section for 'Acta Biológica Colombiana' and a list of navigation options: 'Área personal', 'Sesión iniciada como: mariana1', 'Mis revistas', 'Mi perfil', 'Ver notificaciones', and 'Gestionar notificaciones'. The main content area is titled 'Envíos activos' and contains a list of submissions. A red box highlights the submission with ID 85059, dated 2020-02-11, by Silva, Batalha, Araújo, Nascimento, etc., with the title 'miR-33 and lipid metabolism: focus on insects as a model' and the status 'En revisión'. The bottom of the page indicates 'Elementos 1 - 1 de 1'.

Id.	Enviar	Secc	Autores/as	Título	Estado
85059	2020-02-11	ART	Silva, Batalha, Araújo, Nascimento,...	miR-33 and lipid metabolism: focus on insects as a model	En revisión