

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THAYS SOUSA FONTES

Inseto *Tribolium Castaneum* como modelo experimental hiperglicêmico: Nova estratégia de estudos

Maceió, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THAYS SOUSA FONTES

Inseto *Tribolium Castaneum* como modelo experimental hiperglicêmico: Nova estratégia de estudos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao  
Instituto de Ciências Farmacêuticas da Universidade  
Federal de Alagoas, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Maceió

2021

**Catálogo na Fonte Universidade  
Federal de Alagoas Biblioteca  
Central  
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

F683i Fontes, Thays Sousa.  
Inseto *Tribolium castaneum* como modelo experimental hiperglicêmico : nova  
estratégia de estudos / Thays Sousa Fontes. – 2021.  
30 f. : il.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade  
Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 27-30.

1. *Tribolium castaneum*. 2. Hiperglicemia - Modelos experimentais. 3. Diabetes  
mellitus. I. Título.

CDU: 615.038: 616.379-008.64:595.76

Thays Fontes

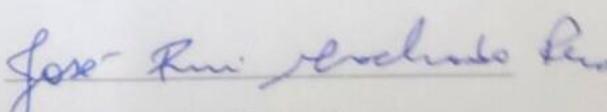
Inseto *Tribolium castaneum* como modelo experimental hiperglicêmico: Nova estratégia de estudos

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à banca avaliadora da Universidade Federal de Alagoas e aprovado no dia 29 de Setembro de 2021.

  
Prof. Dr. Luciano Aparecido M. Grillo  
Coordenador PPGCF / UFAL  
SIAPE 1653558  
Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo  
Coordenador do PPGCF/UFAL

Professor Doutor Luciano Aparecido Meireles Grillo (ICF/UFAL) (Orientador)

Banca Examinadora:



Professor Doutor José Rui Machado Reis (ICF/UFAL)



Professora Doutora Meirielly Kellya Holanda da Silva (Campus Arapiraca-UFAL)

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais e irmã, dedico não só este trabalho, mas todo meu esforço que me fez sair do interior arriscando tudo em nome deles e para eles, merecem todo meu amor e dedicação. Ao meu noivo maravilhoso, que foi a primeira pessoa a me dar força para que eu encarasse o desafio quando tudo era ainda uma ideia, você foi fundamental.

Ao anjo que Deus enviou para me ajudar no meu propósito, que tornou tudo mais leve e bonito, me ensinou a ver sempre o melhor das pessoas e que amor deve ser incondicional, tia Adilma, obrigada por tudo, você pode não ter meu sangue, mas é minha família sim.

Aos meus colegas de turma que passaram tantos perrengues ao meu lado, cada um com seu jeitinho agregaram inúmeras lições a minha pessoa e minha história, sem vocês nada teria a graça que teve, os levo sempre em mim.

Por fim aos meus professores, ao quais tenho a maior admiração do mundo e em especial ao meu orientador, também aos meus amigos de laboratório, Camila, Marianna, Meirielly, Josiel, Thomas, Cledson, Larissa, Ericka, Luana e Valéria que ajudaram em tantas coisas não só acadêmicas, mas em amizade, apoio, amadurecimento e com certeza, também a me fazer uma pessoa melhor, vocês foram e são essenciais para mim, eu não me veria em outro laboratório que não esse, meu LBM.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Jesus Cristo que desde o começo sempre fez tudo perfeitamente para que esta graduação fosse possível, e quando eu mesma duvidei por inúmeras vezes que isso fosse para mim, Ele veio e me mostrou que os sonhos D'Ele são muito maiores que os meus, Ele me ama e acredita em mim mais que eu mesma, e naquele dia que enviou uma pessoa desconhecida para falar comigo no ônibus, eu entendi e decidi que apenas Ele seria capaz de me parar!

## RESUMO

Apesar de ser uma condição crônica a Diabetes Mellitus é considerada uma pandemia, de causa multifatorial e de tratamento complexo, crescendo quanto a sua incidência no mundo, sendo um problema de saúde mas também econômico, estudos mais cada vez mais aprofundados são necessários em relação a seus fatores de risco, fatores de proteção, e quanto a modernização do tratamento, novas opções de modelos de estudos úteis nesta condição são solicitados, os modelos atuais em sua maioria vertebrados, possuem diversos obstáculos, metodológicos, orçamentários ou éticos, os insetos vem crescendo como modelos alternativos que vencem muitas dessas barreiras; Assim o objetivo deste trabalho consistiu em testar a viabilidade do inseto *T.castaneum*, o segundo inseto mais utilizado como modelo atualmente, como uma opção para estudos deste fim, para tal foi adicionado em sua dieta sacarose, após a suplementação foram observados parâmetros de glicemia, lipidograma e ainda resposta ao medicamento de escolha na DM: a Metformina, os resultados mostram uma possibilidade de utilização do inseto como um modelo viável principalmente para *screening* .

**Palavras-chave:** *Tribolium castaneum*, hiperglicemia, modelo, diabetes

## ABSTRACT

Despite being a chronic condition, Diabetes Mellitus is considered a pandemic, with a multifactorial cause and complex treatment, growing in terms of its incidence in the world, being a health problem but also an economic one, more and more in-depth studies are needed in relation to its risk factors, protective factors, and regarding the modernization of treatment, new options for study models useful in this condition are requested, the current models, mostly vertebrate, have several obstacles, methodological, budgetary or ethical, insects have been growing as alternative models that overcome many of these barriers; Thus, the objective of this work was to test the viability of the insect *T. castaneum*, the second most used insect as a model currently, as an option for studies of this purpose, for this sucrose was added to its diet, after supplementation, blood glucose parameters were observed , lipid profile and response to the drug of choice in DM: Metformin, the results show a possibility of using the insect as a viable model mainly for screening.

**KeyWord:** *Tribolium castaneum*, hyperglycemia, model, diabetes

## **LISTA DE IMAGENS**

**Figura 1:** Tipos de diabetes e sua etiologia.

**Figura 2:** *Drosophila melanogaster* também conhecida como mosca-das-frutas ou mosca-do-vinagre.

**Figura 3:** Inseto *Tribolium castaneum* em fase adulta.

**Figura 4:** Estágios de desenvolvimento do *Tribolium castaneum*: ovos, larvas, pupas e adultos.

**Figura 5:** Gráficos de resultados obtidos a partir de teste de indução de hiperglicemia em duas concentrações e medidos em 48 e 144h.

**Figura 6:** Gráfico referente aos níveis de colesterol totais

**Figura 7:** Gráfico referente ao teste de níveis de colesterol HDL.

**Figura 8:** Gráfico referente ao teste de triglicerídeos.

**Figura 9:** Gráfico referente ao teste de retirada da dieta indutora.

**Figura 10:** Gráfico referente ao teste de introdução de metformina nos grupos.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

DM: Diabetes Mellitus

DMG: Diabetes Mellitus Gestacional

DM1: Diabetes Mellitus tipo 1

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

ADA: American Diabetes Association

EASD: European Association for the Study of Diabetes

DIO: Diet induced obesity

NZO: Rato obeso da Nova Zelândia

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CONCEA: Conselho Nacional de controle de experimentação animal.

HDL: High density lipoprotein

TG: Triglicerídeos

## Sumário

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	DIABETES MELLITUS: PROBLEMA MUNDIAL DE SAÚDE PÚBLICA.....	13
2.2	TRATAMENTO DE ESCOLHA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2 .....	14
2.3	MODELOS PARA ESTUDO DO DIABETES MELLITUS .....	14
2.4	INSETOS COMO MODELO .....	17
3	.....	19
3.1	INSETO Tribolium castaneum .....	19
4	OBJETIVOS.....	21
4.1	GERAL .....	21
4.2	ESPECÍFICOS .....	21
5	MATERIAL E MÉTODOS .....	22
5.1	COLONIA.....	22
5.2	INDUÇÃO DA HIPERGLICEMIA .....	22
5.3	NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL, HDL E TRIACILGLICEROIS .....	22
5.4	TESTE COM METFORMINA.....	23
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	23
6.1	INDUÇÃO DE HIPERGLICEMIA.....	23
6.2	NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL, HDL E TRIACILGLICEROIS .....	24
6.2.1	Colesteróis totais.....	24
6.2.2	Colesterol HDL.....	24
6.2.3	Triglicerídeos.....	25
6.3	NÍVEIS DE AÇÚCAR POS RETIRADA DE DIETA HIPERGLICEMIANTE.....	26
6.4	NÍVEIS DE AÇÚCAR DIANTE DA ADIÇÃO DE METFORMINA .....	27
7	CONCLUSÃO .....	28
8	REFERÊNCIAS .....	29

## 1 INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) síndrome de evolução crônica; é caracterizado pela falta da insulina ou incapacidade deste hormônio exercer seu efeito, causando assim alterações glicêmicas e metabólicas que podem ocasionar doenças cardiovasculares, cegueira, insuficiência renal, entre outras complicações. (AIRES; 2014) De etiologia múltipla, causa prejuízo considerável a vida do indivíduo, além de sua origem não ser exatamente esclarecida, sabe-se que diversos são os fatores predisponentes e agravantes, além de que o seu tratamento é difícil pois as alternativas farmacológicas dependem também de mudança de estilo de vida para sua eficácia, o que pode tornar-se um obstáculo para o paciente, DM está intimamente ligada com outras condições como dislipidemias, obesidade, hipertensão e problemas cardiovasculares, além de ser um grande fator de risco em outras doença como no momento atual com a COVID-19. Para novos estudos a fim de modernizar os conhecimentos sobre a síndrome e seu tratamento, estudos mais detalhados precisam ser realizados, os modelos atuais para o estudo do DM costumam ser onerosos, limitados e de aprovação complexa por parte de órgãos de controle da experimentação animal por conta do forte apelo para o não uso de animais em pesquisas, isso tudo culmina para a adoção de novas estratégias no meio da pesquisa científica, neste cenário aparecem os animais invertebrados, em especial artrópodes como um opção crescente de modelo, (FREIRE; 2018). O inseto *T. castaneum* é considerado uma praga de produtos armazenados de grande importância, principalmente de cereais como milho, arroz e trigo (FARONI & FRABETTI, 2009). Por este motivo se tornando alvo de estudos e pesquisas voltados a controle de população, por se tornar alvo dessa maneira já possui seu genoma totalmente conhecido, o que o faz uma possível opção de objetos de estudo em fisiologia e metabólica, em seu genoma possui inúmeras partes conservadas que fazem correlação com metabolismo mamífero por exemplo (RICHARDS et al., 2008). Utiliza-lo como um objeto de estudo seria uma barreira a menos nas pesquisas que hoje utilizam modelos mamíferos e que possuem intenso controle, além das tão válidas questões éticas impostas, pode-se citar ainda barreiras financeiras pois são altos custos para adquirir, manter, manusear, e cuidar de animais com fins científicos, se torna um grande empecilho financeiro e estrutural para instituições de pesquisa, Buscar novas opções que contribuam para facilitar todo o processo de aprovação e andamento de pesquisas, principalmente com a possível aplicação do conhecimento em doenças como o Diabetes Mellitus, grande problema de saúde pública mundial. O presente trabalho de dispõe a testar a viabilidade de *T. castaneum* como um possível modelo de hiperglicemia, visando posteriormente a aplicação em estudos mais detalhados a respeito da síndrome e de seu tratamento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DIABETES MELLITUS: PROBLEMA MUNDIAL DE SAÚDE PÚBLICA

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico, caracterizado por hiperglicemia persistente, que ocorre devido a uma deficiência na produção e ou utilização da insulina. Esta hiperglicemia persistente é a responsável por consequências diversas com repercussão na saúde e bem-estar do indivíduo. Estima-se que 1 a cada 11 pessoas no mundo tenha diabetes, e os números em 1980 eram 108 milhões, já em 2014 as estatísticas apontavam 422 milhões de diabéticos no mundo (Organização Mundial da Saúde) inclusive estima-se também que metade das pessoas nem saibam de seu diagnóstico. No Brasil entre 2006 e 2016 o aumento foi de 60% nos números de casos, e estima-se que em 2040 os gastos com a doença atinjam cerca de 117 bilhões (Ministério da saúde). Esse distúrbio apresenta uma classificação de acordo com sua etiologia.

Figura 1: Tipos de diabetes e sua etiologia

Tipos de diabetes	
1	DM tipo 1: - Tipo 1A: deficiência de insulina por destruição autoimune das células $\beta$ comprovada por exames laboratoriais; - Tipo 1B: deficiência de insulina de natureza idiopática.
2	DM tipo 2: perda progressiva de secreção insulínica combinada com resistência à insulina
3	DM gestacional: hiperglicemia de graus variados diagnosticada durante a gestação, na ausência de critérios de DM prévio
4	Outros tipos de DM: - Monogênicos (MODY); - Diabetes neonatal; - Secundário a endocrinopatias; - Secundário a doenças do pâncreas exócrino; - Secundário a infecções; - Secundário a medicamentos.

Fonte: Diretriz Brasileira de Diabetes, 2019.

Diabetes mellitus gestacional (DMG) : é caracterizada por estado hiperglicêmico causado por hormônios liberados pela placenta, em mulheres que não possuíam diabetes antes da gestação, esses hormônios causam uma hiperglicemia que se soma ao efeito das enzimas também placentárias que degradam a insulina e induzem um efeito compensatório, causando resistência á insulina e estado diabetogênico, apesar da condição normalmente se resolver pós parto, a DMG pode trazer sérios riscos a gestante e ao bebe, caracterizando ainda um importante fator de risco de desenvolver DM2.

O Diabetes *mellitus* tipo 1(DM1) é uma doença autoimune, que ocorre devido a destruição das células  $\beta$  do pâncreas, acarretando uma não produção ou produção insuficiente de insulina, corresponde de 5 a 10% dos casos de diabetes, e o Brasil ocupando o terceiro lugar no mundo segundo a *International Diabetes Federation*, sendo principalmente diagnosticada na infância ou adolescência. Pode ser dividida em tipo 1A ou tipo 1B, de acordo também com sua origem, sendo respectivamente uma pela destruição das células beta comprovada por exames, outra pela deficiência de insulina do tipo idiopática.

Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) corresponde a grande maioria de casos mundiais (90 a 95%), possuindo sua etiologia multifatorial e complexa, mesclando componente ambiental e genético. Muito embora tenham crescido os números de casos em crianças e jovens, é muito mais

prevalente em adultos, estes a partir dos 40 anos. O (DM2) em especial é considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento. As crescentes, incidência e prevalência são atribuídas ao envelhecimento populacional e aos avanços no tratamento da doença, mas, especialmente, ao estilo de vida atual, caracterizado por inatividade física e hábitos alimentares que predisõem ao acúmulo de gordura corporal. (Sociedade Brasileira de Diabetes).

## 2.2 TRATAMENTO DE ESCOLHA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2

O tratamento do diabetes Mellitus tipo 2 pode ser complexo, por se tratar de uma síndrome que está intimamente ligada com hábitos alimentares e sobrepeso do paciente, fazendo com que a principal medida não farmacológica seja a reeducação quanto ao estilo de vida do paciente, o que culturalmente é um desafio na sociedade atual, a American Diabetes Association (ADA) e pela European Association for the Study of Diabetes (EASD) colocam a metformina como fármaco de primeira escolha para o tratamento do DM2, porém o tratamento farmacológico em monoterapia pode se mostrar insuficiente.

A Metformina é um representante da classe das biguanidas e o principal efeito anti-hiperglicemiante da metformina consiste na redução da gliconeogênese hepática, além disso, ela diminui a absorção gastrointestinal de glicose, aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos muscular e adiposo, e melhora indiretamente a resposta da célula  $\beta$  à glicose por reduzir a glicotoxicidade e os níveis de ácidos graxos livres. Nos tecidos periféricos, a metformina facilita o transporte de glicose por aumentar a atividade da tirosina quinase nos receptores de insulina e a translocação de transportadores de glicose para a membrana celular. Em adição, um efeito protetor nas células  $\beta$  tem sido demonstrado em ensaios in vitro. (ROVARIS, 2010).

## 2.3 MODELOS PARA ESTUDO DO DIABETES MELLITUS

Para estudos em obesidade e síndromes metabólicas, os animais mais empregados são os mamíferos roedores, estes divididos principalmente em: Modelos geneticamente modificados, estes sendo os mais utilizados, e os modelos Obesos induzidos por dieta (diet-induced obesity - DIO).

**Animais monogênicos:** Os modelos geneticamente modificados mais usados são os monogênicos (mutação ligada a um gene apenas) esses, tem como vantagem desenvolver doenças de forma mais grave e com fenótipo bem característico, costumam propiciar estudos mais curtos e pelo fato de não precisarem do tempo que seria necessário para a indução de uma dieta como nos indivíduos DIO, pela sua genética de base homogênea podem ter os fatores ambientais melhor controlados e menos interferentes os resultados obtidos são menos variáveis, propiciando assim a possibilidade de um N menor no estudo, porém essas mesmas características podem significar um ponto negativo se observado que essas doenças estudadas nesses animais são multifatoriais e com interferências de diversos fatores, trazendo uma distância maior do comparativo fisiológico esperado de um indivíduo humano acometido por essas síndromes. Segundo FUCHS, 2018. Além das citadas outra desvantagem dos animais monogênicos é a alta mortalidade devido à cetose em determinadas linhagens, como no caso do camundongo db/db, além da necessidade de manutenção sofisticada dos animais, o que pode inviabilizar a pesquisa.

“Apesar dos camundongos db/db serem muito utilizados para o estudo do DM2 e suas complicações, como a retinopatia e neuropatia, estes animais não desenvolvem todas as

alterações encontradas em humanos, como por exemplo, a deposição amiloide em pâncreas”. (FUCHS, 2018).

“Em geral, o custo de um animal monogênico é de no mínimo 100 a 400 dólares, variando com a linhagem escolhida, o que pode ainda aumentar dependendo do sexo, peso e idade escolhidos para a pesquisa. Já o rato Wistar e o Sprague Dawley (SD), modelos DIO mais utilizados, podem ser adquiridos, em média, por 20 dólares cada”. (FUCHS, 2018).

**Animais poligênicos:** São os que possuem mais de um gene participante da herança em questão. O rato obeso da Nova Zelândia (NZO) é um dos mais usados, este indivíduo mesmo em dietas pobres em gordura, possui obesidade juvenil e hiperfagia e pode desenvolver DM2, para melhora da linhagem este tipo de rato foi cruzado com uma variante em intolerante a glicose, porém apesar do resultado ser de na maioria das vezes animais saídos com a afecção, por vezes nascem animais não atingidos por DM, o que só reforça a complexidade da síndrome.

(RUSSEL, 2006). Existe ainda outras linhagens a exemplo da estirpe de roedor JCR:LA que é a mais utilizada, por desenvolver, além de aterosclerose, isquemia cardíaca e resistência à insulina. Essa linhagem apresenta obesidade muito mais extrema do que a observada em rato Zucker, assim como, hiperlipidemia grave. Apesar disso, esse modelo possui diferenças significativas na morfologia das lesões ateroscleróticas e não podem demonstrar ainda a mesma patogênese dos humanos.

A principal característica das linhagens de animais modificados geneticamente utilizados nesses estudos é que já nascem obesos, diferentemente de como acontece nos humanos na grande maioria dos casos, onde esse evento acontece ao longo do tempo, além do mais em pacientes diabéticos o grau de sobrepeso pode ser muito variável, e sendo mais grave em indivíduos mais velhos, já nesses roedores acontece o inverso, o que pode comprometer a fidedignidade da comparação na pesquisa e dificultar a observação dos fatores predisponentes e ou influentes na instalação do quadro e prognóstico do acometido.

**Animais DIO (Obesos induzidos por dieta):** Estes animais costumam ser mais utilizados para observar aspectos ligados a fisiopatologia das síndromes metabólicas, estudos com fármacos, e influência do papel da dieta nos indivíduos, sendo os que mais se assemelham com a progressão das síndromes em humanos, porém possuem como ponto negativo da sua utilização a não uniformização de resultados pois, a dietas podem se mostrar sem um padrão bem definido nos animais, além de que a depender da linhagem de animais esse padrão é ainda mais difícil, tornando os resultados muito variáveis até mesmo numa mesma linhagem, a fonte da dieta e sua composição mesmo que tentando ao máximo se assemelhar a humana (composta majoritariamente por carboidratos e gordura) se torna complexa produzindo um animal com um padrão de síndrome não semelhante entre indivíduos.

“Determinadas linhagens, como a de camundongos S5B/PI ou A/J são considerados resistentes à obesidade induzida por dieta, enquanto ratos SD e Wistar desenvolvem essa afecção mais facilmente, o que mostra que a base genética é importante no ganho de peso corporal” (NILSON, 2012).

**Outros modelos:** Existem ainda outros modelos animais, primatas não humanos apresentam um padrão de desenvolvimento de obesidade e síndromes metabólicas semelhantes a humanos, por meio de dieta hipercalórica e os mecanismos das síndromes nesses animais também se mostram parecidos quando há excesso de peso.

Alguns animais domésticos como gatos e cães podem ser utilizados uma vez que estão sob algumas condições predisponentes semelhantes aos humanos, como má alimentação, sedentarismo, e gatos desenvolvem DM de forma também assemelhada a humanos, com resistência insulínica e estado de pré diabetes além de estudos ainda que iniciais indicarem que nesses também parece se tratar de uma doença de características poligênicas. Já os cães por motivos não conhecidos parecem apresentar uma resistência ao desenvolvimento de DM, apesar de utilizados em comorbidades ligadas a obesidade são raros os casos em que desenvolvem DM, mesmo apresentando resistência à insulina, parecem contar com um sistema de compensação da hiperglicemia, ou ainda os humanos podem estar sujeitos a condições desfavoráveis que estas espécies não estão. (Verkest, 2014).

Porcos são modelos bem utilizados, devido a propensão ao aumento de peso, e aspectos anatômicos, fisiológicos e metabólicos semelhantes aos humanos, mas como em outros casos também acabam sendo dispendiosos e fazendo com que as pesquisas no geral se tornem longas. *Minipigs* começaram recentemente a serem usados por possuírem um tamanho menor, porém até o momento não demonstraram desenvolver DM, e são um modelo ainda não caracterizado.

Peixes zebra tem sido utilizados para estudos com relação a obesidade, entre outras características favoráveis esses animais, apresentam em análises de transcriptoma de tecido adiposo que possuem metabolismo lipídico similar ao de humanos, apresentando consequências como esteatose hepática, aumento de peso e hipertrigliceridemia em comparação a peixes com dieta normal, estes peixes podem ainda ser usados em modelos de DM se submetidos a ficarem submersos em solução de glicose, porém este método é totalmente distinto de como acontece a síndrome em humanos.

Além das dificuldades inerentes a fisiologia de cada modelo aqui exemplificado, é importante ressaltar a dificuldade quanto a legislação que regulamenta o uso de animais em pesquisas, ao longo dos anos cresce o apelo contra o uso de animais em pesquisas então a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (Unesco), durante evento realizado em Bruxelas em 1978, firmou a *Declaração Universal dos Direitos dos Animais*, levando a sociedade a debater, de maneira ainda mais intensa, a necessidade da experimentação animal. (GUIMARÃES, 2016).

Criou-se então a Lei 6.638, em 8 de maio de 1979, para normatizar a experimentação em animais em instituições de ensino superior, determinando que essas pesquisas poderiam ser realizadas desde que os animais não sejam mantidos em condições que lhes causem sofrimento (BRASIL, 1979). Já em 2008 aprovou-se o Projeto de Lei 1.153/1995, de autoria do ex-deputado Sérgio Arouca (BRASIL, 2013), transformado na Lei Ordinária 11.794/2008 (BRASIL, 2008), que revogou a lei anterior e atualmente regulamenta a criação e a utilização de animais em atividades didáticas e em pesquisa científica em todo o território brasileiro. Em seu artigo 13, determina que todas as instituições responsáveis por criar ou utilizar animais para ensino e pesquisa deverão ser legalmente estabelecidas em território nacional, ter credenciamento no Concea (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e criar uma ou mais Ceua (Comissão de Ética no Uso de Animais), onde estas instituições são responsáveis por coordenar e regular a experimentação, pesando sempre se a relação custo x benefício da pesquisa vale a pena, custo aqui sendo entendido como a possibilidade de sofrimento animal, frente a benfeitoria que aquela pesquisa em questão poderá trazer, o conceito de bem estar animal, deixa pra trás a ideia de que a única preocupação em relação aos animais fossem quanto

a diminuição de variáveis que pudessem interferir nos resultados e passa além disso a ser com o quão é ético e quais os limites do uso de animais.

A experimentação animal, sobretudo voltada a pesquisas científicas, não deve ser banida, já que o avanço obtido no conhecimento de fisiologia, farmacologia e patologia não teria sido possível sem estudos *in vivo*. (GUIMARÃES, 2016). Diante do exposto e da ainda crescente pressão popular e dos órgãos de proteção animal, ainda são necessárias novas estratégias de substituição, ou pelo menos diminuição do uso em especial de animais vertebrados, uma vez que de forma geral, as legislações relacionam-se à proteção dos animais vertebrados, pois invertebrados, salvo suas exceções, são animais em que não se tem evidências que sejam seres capazes de perceber sofrimento e dor, devido seus sistemas nervosos extremamente mais simples em relação a vertebrados. (OLIVEIRA e GOLDIM, 2014)

Neste contexto se insere a crescente utilização de insetos em pesquisas, com vantagens que perpassam desde manejo e manutenção muito mais simples e menos dispendiosa, como também a não necessidade de submissão em comitês de ética para realização de estudos, dito isto, a classe Insecta se torna uma opção promissora especialmente em estudos genéticos, bioquímicos, celulares e moleculares (GRILLO, 2005).

#### 2.4 INSETOS COMO MODELO

Sendo um dos grupos mais importantes do reino animal, representando cerca de 70% de todos os representantes entre as espécies conhecidas (HOY, 1994; CHOWANSKI et al., 2017), os insetos são extremamente importantes não só ecologicamente, mas em aspectos econômicos e até mesmo médico. (LEHANE, 1991). Apresentam grande sucesso evolutivo e são seres super adaptados, características diversas nesses animais puderam propiciar esse sucesso, entre essas, além de sua grande variedade morfológica, pode-se citar também o fato de sua grande maioria apresentar um ciclo de vida com metamorfose completa, a presença de asas que os possibilitou explorar diversos ambientes, e assim garantir fluxo gênico através de migração (MARANHÃO, 1977; CHOWANSKI et al., 2017), busca de alimentos em ambientes diversos e defesa contra predadores mais eficiente.

Além das características citadas, alguns outros fatores foram fundamentais para esse destaque da classe Insecta, o fato de em sua grande maioria possuir um ciclo de vida bem específico onde larva e adultos se alimentam de fontes diferentes e serem holometábolos, ou seja, possuírem metamorfose completa, onde passam respectivamente pelas fases de ovo, larva, pupa, e adulto, também por esse ciclo de vida ser curto e possuir grande número de descendentes. Mas essas características muito mais que sucesso ecológico destacam os insetos como ferramentas de estudos alternativas aos vertebrados, as características favorecem por exemplo o manuseio de insetos, por apresentarem a possibilidade de fácil manutenção, por seus tamanhos de corpos e órgãos reduzidos, facilidade de acompanhar várias gerações de suas proles, e ainda, por sua manutenção muito fácil e menos onerosa em relação a outras opções de animais modelo. Insetos apresentam ainda a facilidade de possuir muito menos barreiras éticas que dificultem seu manejo, essa classe possui sistema nervoso muito simples e conseqüente menor percepção de sofrimento (OLIVEIRA e GOLDIM, 2014).

Já se tem diversos exemplos de sucesso em relação a utilização de insetos, descobertas importantes que puderam ser utilizadas para benefício humano, como a observação do processo de seleção natural em mariposas (*Biston betularia*) (FISHER, 1933) estudos realizados em *Drosophila melanogaster* levaram ao estabelecimento de conceitos básicos de citogenética e

biologia do desenvolvimento, como a demonstração da localização dos genes nos cromossomas (MURRAY & HUNT, 1993) ela é atualmente o inseto mais utilizado, isso devido ao fato de possuírem 289 genes ortólogos aos genes humanos responsáveis por doenças, na *FlyBase*, uma base que consolida cerca de 800 trabalhos que descrevem a relação de doenças humanas específicas com genes da *D. melanogaster*, indica a conservação de várias vias metabólicas e de sinalização entre estas espécies (ORIEL; LASKO, 2018).

O principal vetor da Doença de Chagas o *Rhodnius prolixus* (LENT & WYGODZYNSK, 1979) foi um dos primeiros a ser utilizado para análises de metabolismo do grupo dos artrópodes, e neste foi possível obter a maioria das informações sobre o metabolismo energético de insetos, o *Rhodnius prolixus* tem seu genoma sequenciado (MESQUITA et al., 2015) e permite que ainda mais estudos sejam realizados, visando seu controle biológico.

São poucos os genomas de insetos totalmente descritos que estão disponíveis em bancos de dados, mas a riqueza de informações permite os estudos sobre as semelhanças entre sequências de aminoácidos de insetos e também entre insetos e humanos.

Figura 2. *Drosophila melanogaster* também conhecida como mosca-das-frutas ou mosca-do-vinagre.



Fonte: Google

### 3

#### 3.1 INSETO *Tribolium castaneum*

Conhecido como besouro vermelho da farinha, *Tribolium castaneum* (Fig 3) membro da ordem Coleoptera e família Tenebrionidae é considerado uma importante praga de cereais armazenados que implica em grandes perdas econômicas e alimentares todos os anos. (FARONI & FRABETTI, 2009).

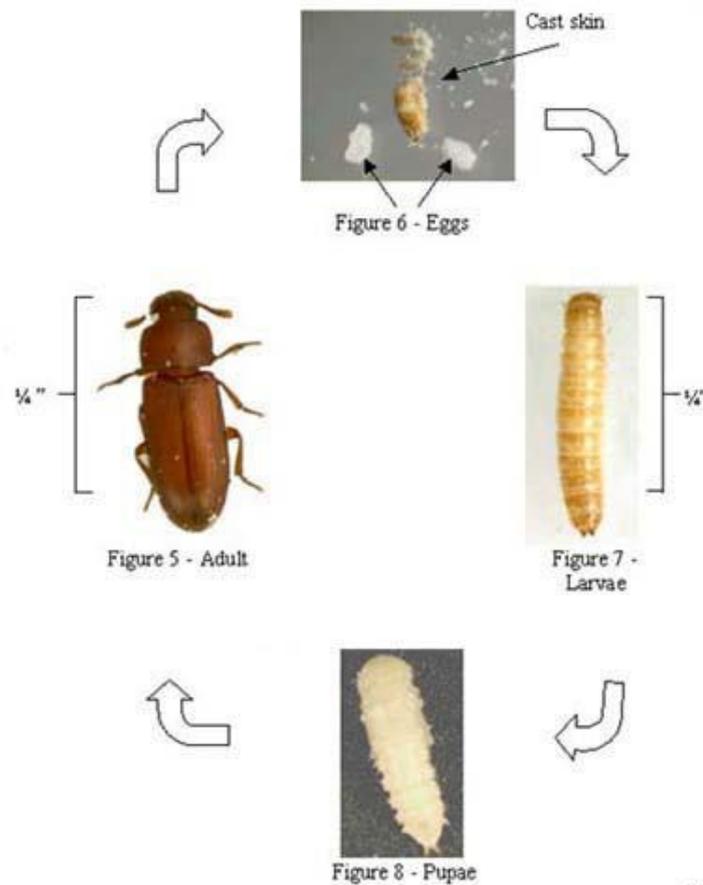
Figura 3: Inseto *Tribolium castaneum* em fase adulta



Fonte: [https://www.agrolink.com.br/problemas/besouro-castanho\\_1928.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/besouro-castanho_1928.html) – Acesso em 28 de dezembro de 2020

Possui ciclo de vida (Fig 4) que dura em média de 30 a 40 dias e que é chamado holometábolo, ou seja, passam por quatro estágios de vida, estes são; ovo, larva, pupa e por fim adulto, concluindo um ciclo de metamorfose completo, seus ovos medem aproximadamente 0,6 x 0,3 mm de comprimento e cada fêmea põe uma média de 450 ovos a cada ciclo (BERNARDO QUÍMICA, 2006). Possui um genoma totalmente descrito e depositado em banco de dados, o que facilita seu uso em estudos de Biologia Molecular (RICHARDS et al., 2008). Por possuírem seus mecanismos biológicos bastante conhecidos, o *T. castaneum* tem sido a segunda escolha como sistema modelo para estudos em insetos, ficando atrás apenas da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*, que lidera os estudos na área de genética (DÖNITZ et al., 2013). O inseto *T. castaneum* tem sido muito utilizado como modelo para estudos de análises genéticas devido à facilidade de sua cultura, alta fecundidade, genoma descrito, ciclo de vida curto e a possibilidade para estudos transgeracionais. Os ovos de *T. castaneum* possuem um período para eclosão é de cerca de 5-7 dias, as larvas passam por 6 a 8 instares até chegarem à fase de pupa. O estágio de pupa de *T. castaneum* dura cerca de 7 dias, sendo o estágio seguinte o de adulto. O inseto possui 16.404 genes identificados e suas sequências apresentam intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos. (FREIRE 2018) o que o torna uma opção promissora para pesquisa.

Figura 4: Estágios de desenvolvimento do *Tribolium castaneum*: ovos, larvas, pupas e adultos.



Fonte: [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red\\_flour\\_beetle.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red_flour_beetle.htm)– Acesso em 28 de dezembro de 2020.

*T. castaneum* e humanos compartilham 126 grupos de genes ortólogos (RICHARDS et al., 2008). Devido à alta homologia observada entre as espécies e o alto grau de conservação em sequências com domínios característicos de famílias de proteínas, muitos estudos têm sido realizados utilizando o *T. castaneum* como modelo, como por exemplo estudos de interação entre fatores nutricionais e expressão gênica utilizando genes homólogos. (FREIRE 2018). Muitos genes duplicados foram observados em *T. castaneum*, principalmente em genes da subfamília CYP450, CYP6 e CYP9, e provavelmente isto que vem causando a grande resistência à inseticidas (DABORN et al., 2005). Este inseto constitui assim uma alternativa importante para a diminuição do uso de animais em laboratórios para testes de *screening* (GRÜNWARD et al., 2013).

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 GERAL**

- Testar a viabilidade de *T. castaneum* como modelo experimental metabólico.

### **4.2 ESPECÍFICOS**

- Induzir hiperglicemia em *Tribolium castaneum*
- Observar possível mudança no lipidograma do inseto tratado
- Analisar as principais consequências dessa indução na fisiologia do inseto
- Incorporar medicamento antidiabético e avaliar suas consequências

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 COLONIA

O cultivo da colônia é realizado no Laboratório de Bioquímica Metabólica localizado na Universidade Federal de Alagoas, os insetos são mantidos em estufa a 30°C com umidade relativa em torno de 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h. Nos experimentos foram testados inseto adultos com idades sincronizadas.

### 5.2 INDUÇÃO DA HIPERGLICEMIA

Para indução da hiperglicemia foram usados adultos sincronizados, em um total de 20 indivíduos, onde foram postos para se alimentar de discos comerciais de farinha de trigo, onde foi incorporada sacarose em duas concentrações sendo 15 e 30% em relação ao peso do disco, a sacarose foi macerada e diluída em metanol 50% e colocada em estufa a 35°C por 24 horas para secagem do disco. O tratamento foi dividido em 48 e 144 horas, ao fim desses tempos os adultos foram mortos por congelamento e seus níveis de açúcares totais foram medidos usando o método colorimétrico fenol-sulfúrico adaptado, que foi medido no espectrofotômetro. Este método descrito por Dubois e colaboradores (1956). Consiste em 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 absorbância obtidos foram convertidos para a concentração através de uma curva de calibração obtida usando a glicose como padrão.

### 5.3 NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL, HDL E TRIACILGLICEROIS

Os insetos depois de terem suplementado sacarose em sua dieta pelo tempo devido como descrito no tópico anterior, também passaram por testes para análise semelhante ao lipidograma feito em humanos. Para análise desses parâmetros bioquímicos, foram utilizados kits Bioclin® monoreagente com adaptação, todos foram padronizados por curva de proteínas pelo método de Bradford (1976) e normalizados para 20 µg de proteínas. O método consiste em utilizar a Albumina de Soro Bovino para a criação da curva padrão (0,01mg/mL até 1mg/mL). As leituras foram realizadas em microplaca, utilizando as seguintes proporções para a reação: 10 µL da amostra + 190 µL de reagente de Bradford, totalizando um volume total de reação de 200 µL e para o branco foi usado 10 µL de água no lugar a amostra. Após o preparo da reação, as amostras foram incubadas por 5 min e logo em seguida medidas as absorbâncias a 595 nm como auxílio de uma leitora de microplacas (Flexstation 3). O experimento foi realizado em triplicata para cada amostra e as unidades correspondentes são mg/ml de proteína. Após a normalização por proteínas os kits foram utilizados conforme instrução do fabricante.

#### 5.4 TESTE COM METFORMINA

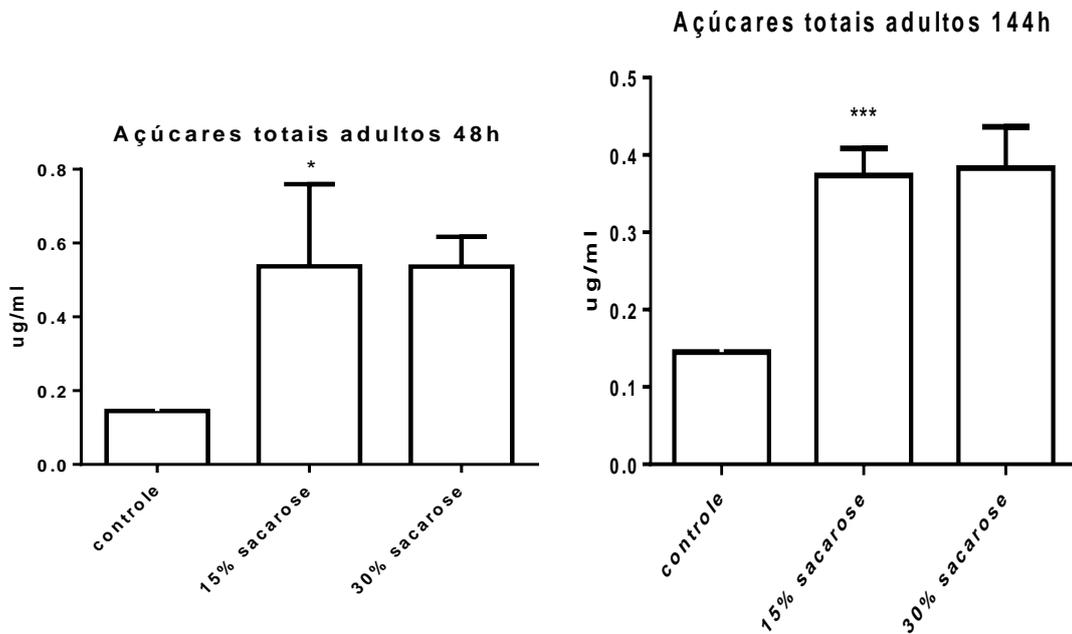
Foi utilizado método semelhante à incorporação do açúcar, neste teste os insetos foram divididos em grupos com o fármaco e dieta base, e grupo com sacarose e fármaco, os insetos se alimentaram durante 7 dias e após o final do tempo foram dosados os açúcares totais dos grupos.

### 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 6.1 INDUÇÃO DE HIPERGLICEMIA

Nos resultados para o teste de ingesta de sacarose em duas concentrações, pode-se observar que os níveis de açúcares na hemolinfa dos insetos apresentam diferença significativa nas duas concentrações em relação ao grupo controle, não sendo notada diferença estatística entre as duas concentrações, mostrando perfis semelhantes, conforme os dias, ambas as concentrações aumentam os níveis de açúcares nos indivíduos de forma expressiva. No tempo de 144h não se percebe grande diferença se comparado ao tempo de 48h, porém os dados desta concentração obtiveram um resultado mais robusto estatisticamente falando, expressando assim um dado ainda mais concreto. Assim considera-se que foi atingido o objetivo de induzir um estado hiperglicêmico nesses grupos de animais.

Figura 5. Gráficos de resultados obtidos a partir de teste de indução de hiperglicemia em duas concentrações e medidos em 48 e 144h.



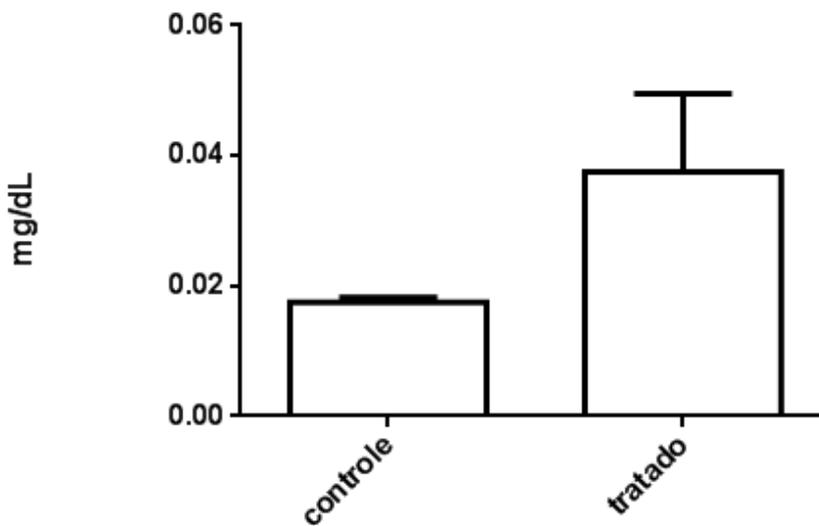
Fonte: Autora

## 6.2 NÍVEIS DE COLESTEROL TOTAL, HDL E TRIACILGLICEROIS

### 6.2.1 Colesteróis totais

Como pode ser observado no gráfico (Figura 6), o resultado desse parâmetro obteve resultado de aumento também significativo no grupo tratado em relação grupo controle, é sabido que a principal fonte de energia em *T. castaneum* são os lipídios, além disso a literatura referente ao processo digestivo e metabolismo de lipídeos em insetos, sugerem que a digestão de lipídeos nesses animais ocorra de forma análoga à dos mamíferos (PONTES et al., 2002; GRILLO et al., 2003; FREIRE 2018). Os insetos não são capazes de sintetizar esteroides de novo (Clark e Block, 1959) dessa forma eles dependem da utilização de esteroides encontrados na dieta para a obtenção dos seus próprios, como colesterol e outros, incluindo os hormônios (ATELLA et al. 2012).

Figura 6: Gráfico referente aos níveis de colesteróis totais



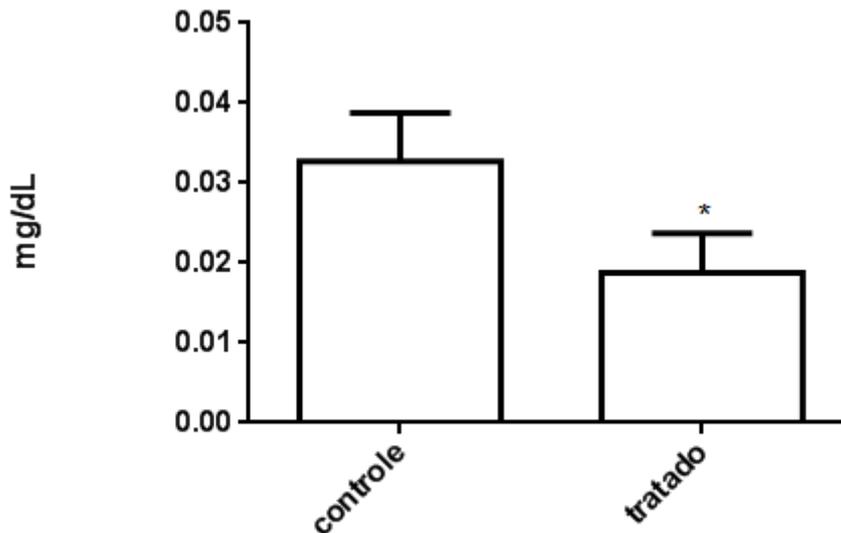
Fontes: Autora

### 6.2.2 Colesterol HDL

Apesar de não haver estudos que confirmem que há uma fração de colesterol tipo HDL (High Density Lipoproteins ou Lipoproteínas de alta densidade) em insetos e que se assemelhe exatamente aos humanos, sabe-se que diferentemente dos mamíferos, onde o transporte de lipídeos é feito por diversas lipoproteínas, nos insetos a lipoproteína Lipoforina (Lp) desempenha sozinha esse papel, transportando as diversas classes entre os vários órgãos (Soulages e Wells, 1994b). Dito isso foi utilizado o teste disponível para quantificação de lipoproteína tipo HDL em humanos, e o resultado obtido como observado na figura 6, foi de que aconteceu uma diminuição, o nível desta lipoproteína diminuída em humanos significa maiores chances de problemas cardiovasculares, como deposição de placas de ateroma em vasos sanguíneos, um vez que sua função nos mamíferos é de retirada de excesso de colesterol dos vasos e condução desse excesso para o fígado, este nível diminuído pode significar de forma parecida ao que ocorre em humanos a um desequilíbrio lipídico. Em pacientes diabéticos é comum se encontrar fenômeno semelhante, pois como já citado o diabetes principalmente do

tipo 2 está intimamente ligado a maus hábitos de vida e sobrepeso, além disso, pessoas diagnosticadas com DM2, possuem um risco de duas a quatro vezes maior de adquirirem doenças cardiovasculares em comparação uma pessoas sem DM2 (AIRES; 2014).

Figura 7: Gráfico referente ao teste de níveis de colesterol HDL

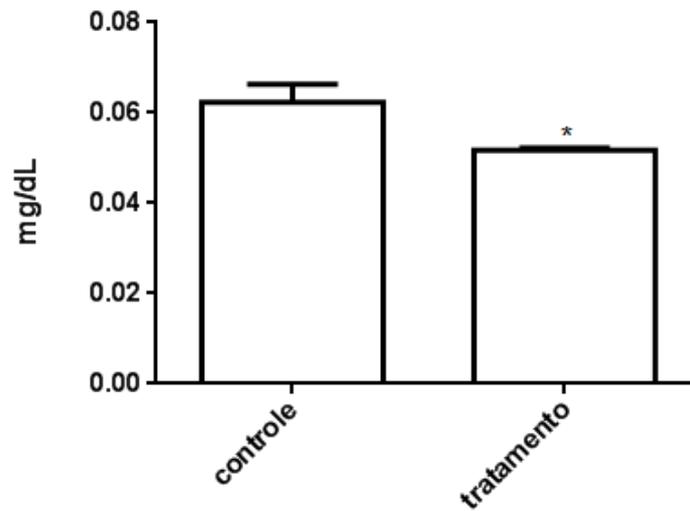


Fonte: Autora

### 6.2.3 Triglicerídeos

É sabido que a principal forma de lipídeo que mantém os insetos de *T. castaneum* são os triglicerídeos (BEENAKKERS et al., 1985) desta forma este lipídeo foi quantificado e ao contrário do que se poderia supor, aconteceu uma diminuição nesses níveis, como mostra a figura 6, como muito sobre o metabolismo de insetos e conseqüentemente de *T. castaneum*, ainda é desconhecido, a perturbação da homeostase deste inseto pode ter sido o suficiente para algum mecanismo de compensação ainda não conhecido, fazendo um paralelo com os pacientes aqui em questão, um paciente diabético tende a ter níveis de triglicerídeos aumentados, porém é válido frisar que diferentemente do inseto a dieta deste tipo de indivíduo é variada, tendo outros macronutrientes sendo ingeridos além de carboidratos, o que poderia ser uma possível explicação para tal. Pacientes com DM2 normalmente são portadores de diversos fatores de risco para doenças aterotrombóticas, tendo as dislipidemias uma atenção especial, pois neste pacientes se verifica um grande aumento de triglicerídeos e uma redução do colesterol HDL (Oliveira; 2014).

Figura 8: Gráfico referente ao teste de triglicerídeos

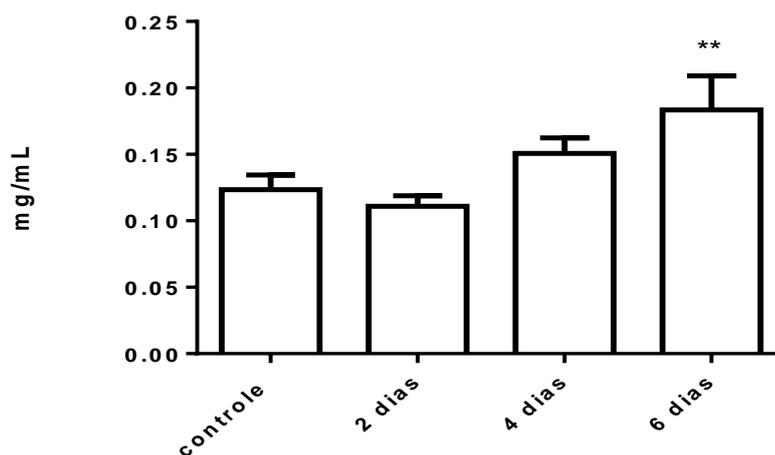


Fonte: Autora

### 6.3 NIVEIS DE AÇÚCAR POS RETIRADA DE DIETA HIPERGLICEMIANTE

Experimentou-se após 7 dias de indução de hiperglicemia com dieta a 30% de sacarose, a retirada da dieta indutora e a troca pela dieta base, essa consistindo no disco de farinha sem aditivo algum, fez-se as devidas medidas de açúcares totais nos dias 2, 4 e 6 pós retirada da dieta suplementada e o perfil glicêmico é apresentado no gráfico seguinte, onde nota-se que mesmo após 6 dias da retirada, a alteração no perfil glicídico do inseto permaneceu sugerindo que a dieta indutora mesmo sendo retirada os efeitos dela podem ser prolongados, novos estudos com durações maiores seriam bem vindos para analisar se esse perfil seria considerado permanente ou “crônico”, como a Diabetes Mellitus.

Figura 9: Gráfico referente ao teste de retirada da dieta indutora



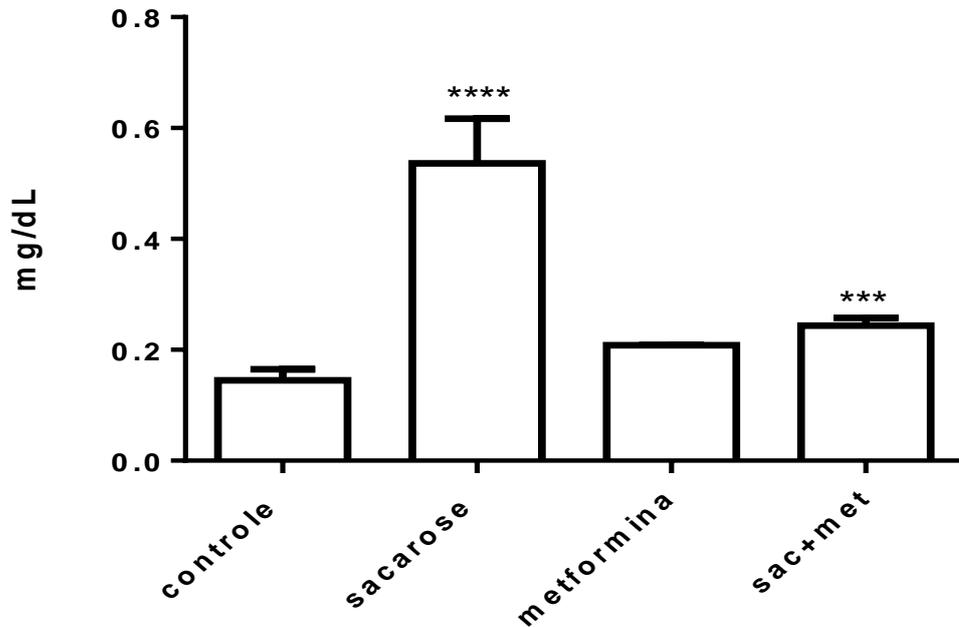
Fonte: Autora

#### 6.4 NIVEIS DE AÇÚCAR DIANTE DA ADIÇÃO DE METFORMINA

Uma vez que foi observado o resultado da indução da hiperglicemia, surgiu a ideia de que da mesma forma que foi incorporada sacarose fosse adicionado um medicamento antidiabético a dieta dos insetos, o intuito dessa conduta seria observar se haveria resposta e conseqüentemente alguma mudança no perfil glicídico dos grupos estudados, semelhante a um paciente em tratamento, nesse ensaio foi escolhido o medicamento de escolha para pacientes diabéticos tipo 2, a Metformina que atua nos humanos reduzindo a produção hepática de glicose e aumentando discretamente a sensibilidade periférica a insulina.

Para esse experimento, foi utilizado além do controle, 3 grupos, consistindo: o primeiro em apenas sacarose no disco, para evidenciar novamente a hiperglicemia, um segundo grupo com metformina incorporada ao disco de farinha puro, ou seja na dieta base, e o terceiro grupo com o disco contendo além da sacarose, Metformina este sendo o grupo que melhor se assemelharia a um indivíduo diabético em tratamento, o perfil desse ensaio pode ser observado no gráfico da figura 9, novamente o grupo que continha a dieta indutora de hiperglicemia teve uma resposta como a anterior, mas de forma interessante o grupo que continha apenas a dieta base suplementada com o medicamento não apresentou mudança considerável de forma muito comparável a um humano que não tem diagnóstico de DM que utiliza esta substância, visto que este medicamento apesar de não ter seu mecanismo completamente elucidado, se tem conhecimento que não tem ação hipoglicemiante, mas sim anti-hiperglicemiante agindo no diabético de outras formas como já citado “age na redução da gliconeogênese hepática, além disso, ela diminui a absorção gastrointestinal de glicose, aumenta a sensibilidade à insulina nos tecidos muscular e adiposo, e melhora indiretamente a resposta da célula  $\beta$  à glicose por reduzir a glicotoxicidade e os níveis de ácidos graxos livres.” Isto na prática seria o mesmo que afirmar que a Metformina não tem capacidade de baixar diretamente a glicemia, mas sim de impedir que ela suba, motivo pelo qual essa substância tem diversas outras indicações além do Diabetes e não provoca alterações glicêmicas importantes nesses usuários. Ainda de forma comparável, se observa o resultado do grupo que utilizava a dieta indutora mais a substância, uma diminuição acentuada na glicemia, ainda que no inseto e no comparativo com humano, ambos ainda sejam considerados hiperglicêmicos, muito próximo ao que se encontra no paciente com a DM controlada.

Figura 10: Gráfico referente ao teste de introdução de metformina nos grupos



Fonte: Autora

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos pode-se perceber a viabilidade do inseto *T. castaneum* como modelo de estudos metabólicos em especial com intuito de mimetizar o metabolismo de um indivíduo diabético, obviamente por ser um organismo ainda distante filogeneticamente do ser humano mesmo com todas as semelhanças metabólicas aqui mostradas, *T. castaneum* é fisiologicamente menos complexo e obviamente possuindo suas particularidades próprias à espécie, assim faz-se necessárias adaptações quanto ao manejo dos experimentos, tratamento de dados e interpretação dos resultados, mas pode-se perceber que *T. castaneum* é uma importante ferramenta de auxílio no entendimento da fisiologia de doenças diversas, como doenças crônicas assim como diabetes, por suas sequências genéticas conservadas, esses estudos podem fornecer um panorama de vias metabólicas importantes no homem, não só em respostas a desequilíbrios no organismo, mas também em possíveis respostas à medicamentos, sendo ainda um organismo que sirva de triagem antes dos estudos com mamíferos, denotando acima de tudo maior economia e segurança, tudo isso com menos barreiras éticas.

## 8 REFERÊNCIAS

AIRES, Sabrina de Mendonça; MEDEIROS, Josimar dos Santos. Perfil lipídico de pacientes diabéticos: prevalência e correlação com a glicemia, 2014.

ATELLA, Georgia C.; MAJEROWICZ, David; GONDIM, Katia C. Metabolismo de Lipídeos. 2012.

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.

BERNARDO QUÍMICA. Manual de identificação de pragas de produtos armazenados. 3 Ed. São Vicente, 2006.

Bosi E. Metformin--the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us?.

Brasil. Presidência da República. Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais e determina outras providências; revogada pela Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008. [Internet]. Diário Oficial da União. Brasília; 10 maio 1979 [acesso 20 maio 2016]. Seção 1. Disponível: <http://bit.ly/25utE14>.

Brasil. Câmara dos Deputados. Projeto de Lei nº 1.153, de 1995, do deputado Sérgio Arouca. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Brasília; 1995.

Brasil. Presidência da República. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. [Internet]. Diário Oficial da União. 2008 [acesso 20 maio 2019]. Seção 1. Disponível: <http://bit.ly/1WV52wP>.

CLARK, A. J.; BLOCH, Konrad. The absence of sterol synthesis in insects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 10, p. 2578-2582, 1959.

CHACRA, Antonio Roberto. Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes sobre o diagnóstico e classificação do Diabetes Mellito e tratamento do diabetes tipo 2. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 14-15, 2001.

Dominguez LJ, Davidoff AJ, Srinivas PR, Standley PR, Walsh MF, Sowers JR. Effects of metformin on tyrosine kinase activity, glucose transport, and intracellular calcium in rat vascular smooth muscle. *Endocrinology*. 1996;137:113-21.

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, 8p, 2013.

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 de jun. 2017.

FUCHS, Taíse et al. Modelos animais na síndrome metabólica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 45, n. 5, 2018.

FREIRE, Camilla Camerino Santana Davino et al. Metabolismo de lipídeos em inseto coleóptero: digestão e transporte de ácidos graxos. 2018.

GUIMARÃES, Mariana Vasconcelos; FREIRE, José Ednézio da Cruz; MENEZES, Lea Maria Bezerra de. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista bioética**, v. 24, n. 2, p. 217-224, 2016.

GROSS, Jorge Luis; NEHME, Marcio. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 3, p. 279-284, 1999.

Harwood HJ Jr, Listrani P, Wagner JD. Nonhuman primates and other animal models in diabetes research. *J Diabetes Sci Technol*. 2012;6(3):503-14.

Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49:2063-9.

Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med*. 2002;137:25-33.

LEHANE, M. J. **Biology of blood-sucking insects**. Harper Collin Academic. 1991, p.77-85.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 163, p. 125-520, 1979.

MESQUITA, R. D.; VIONETTE-AMARAL, R. J.; LOWENBERGER, C. et al. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. n. 112, v. 48, p. 14936-14941, 2015.

MURRAY, A.; HUNT, T. **The cell cycle**. Ed. Oxford University, Oress, New York, 1993.

NETA, Raimunda Nonata Fortes Carvalho. Bioética E uso de animais invertebrados em pesquisa: Uma Abordagem Histórico-Legislativa. 2016.

Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(2):173-81.

OLIVEIRA, J. E. P.; VENCIO, S. (Org.). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura. Declaração universal dos direitos dos animais. [Internet]. Bruxelas: Unesco; 27 jan 1978 [acesso 20 maio 2016]. Disponível: <http://bit.ly/1nqXSM0>

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.

ROVARIS, Diego Luiz et al. Metformina e Diabetes Melito Tipo 2: Passado, Presente e Farmacogética. **Clinical & Biomedical Research**, v. 30, n. 4, 2010.

Russell JC, Proctor SD. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2006;15(6):318-30.

SOULAGES, José L .; WELLS, Michael A. Lipophorin: a estrutura de uma lipoproteína de inseto e seu papel no transporte de lipídeos em insetos. **Avanços na química de proteínas** , v. 45, p. 371-415, 1994.

SOUSA, Ana Paula de; BREHMER, Laura Cavalcanti de Farias; TERRA, Jakeliny Serafini. Agir e Educar em face ao diabetes mellitus. 2017.

Verkest KR. Is the metabolic syndrome a usefull clinical concept in dogs? A review of the evidence. Vet J. 2014;199(1):24-30.