



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

CAMILLA CAMERINO SANTANA DAVINO FREIRE

**METABOLISMO DE LIPÍDEOS EM INSETO COLEÓPTERO: DIGESTÃO E
TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS.**

Maceió
2018

CAMILLA CAMERINO SANTANA DAVINO FREIRE

**METABOLISMO DE LIPÍDEOS EM INSETO COLEÓPTERO: DIGESTÃO E
TRANSPORTE DE ÁCIDOS GRAXOS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Co-orientador: Profa. Dra. Katia Calp Gondim

Maceió
2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante – CRB:1664

F866m Freire, Camilla Camerino Santana Davino.

Metabolismo de lipídeos em inseto *coleóptero*: digestão e transporte de ácidos graxos / Camilla Camerino Santana Davino Freire. – 2018.

136 f. : il. color., grafs., tabs.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.

Coorientadora: Kátia Calp Gondim..

Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 73-88.

Anexos: f. 89-136.

1. FATP. 2. RNAi. 3. qPCR. 4. Lipídeos. 5. *Tribolium castaneum*. 6. Coleóptera.
I. Título.

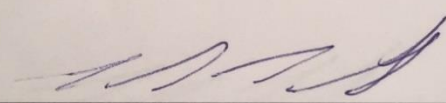
CDU: 577.2

Folha de Aprovação

AUTORA: CAMILLA CAMERINO SANTANA DAVINO FREIRE

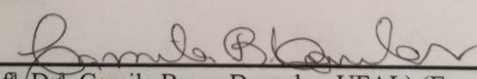
(Metabolismo de lipídeos em inseto coleóptero: Digestão e transporte de ácidos graxos / tese de Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Alagoas)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular. Aprovada em 17 de agosto de 2018.

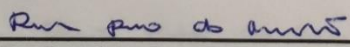


Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo (Orientador)

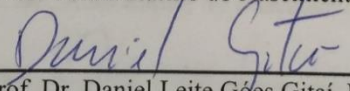
Banca Examinadora:



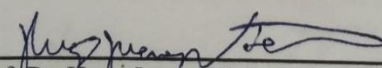
(Prof.ª Dr.ª Camila Braga Dornelas, UFAL) (Examinador Externo)



(Prof.ª Dr.ª Ruth Rufino do Nascimento, UFAL) (Examinador Externo)



(Prof. Dr. Daniel Leite Goes Gitaí, UFAL) (Examinador Externo)



(Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira, UFAL) (Examinador Interno)

À Deus e à minha família...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela realização dos planos Dele na minha vida, por me dar forças e orientar o meu caminho, por me permitir realizar este sonho.

Aos meus pais Carmem e Euriberto por serem sempre presentes, por acreditarem tanto em mim, por serem sempre meu porto seguro e por todo amor dedicado...

À toda minha família por todo apoio e torcida para a realização deste sonho.

Ao meu marido Raphael por acreditar tanto em mim, me dar forças, por todo amor e por tanta paciência.

Às minhas pequenas Otávia e Lis, por encherem minha casa de alegria, por todo amor e por todos os momentos de descontração.

Às minhas amigas Nadyane, Marília, Janaína Menezes, Larissa, Lara, Manuella, Janaína Ferraz por estarem sempre disponíveis, por todo carinho e amizade, por compreenderem minhas ausências, por me escutarem nos momentos de desabafo, por sempre vibrarem com minhas conquistas.

Ao meu orientador e amigo Luciano Grillo, por acreditar que eu sempre posso mais, por toda a orientação e puxões de orelha. Agradeço imensamente as oportunidades que você me deu, por ter me ensinado a ser persistente, a não desistir e por ter me “empurrado” para o caminho da pesquisa, o qual não estava nos meus planos, mas onde agora me sinto realizada. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Profa. Katia Gondim, por mesmo à distância se fazer presente e por me mostrar novos olhares para o meu próprio trabalho. Aos colegas David e Michele pelo auxílio. À Mariana e David por tanto empenho nos experimentos de RNAi.

Em especial aos meus colegas de laboratório, verdadeiros amigos, que nunca mediram esforços para ajudar quando necessário: Josiel e Thomás.

Aos amigos de laboratório Mariana, Valcilaine, Danilo, Thays, Erika, Luana, Larissa, Meirielly, Janaína Kívia, Emanuel, João Carlos, Diogo e Elen por todo o apoio, por fazerem o dia-dia, às vezes árduo, parecer mais leve.

Ao Prof. Daniel Gitaí pela disponibilidade, acolhimento e orientação nos experimentos de qPCR. E à toda família LBCM por todo apoio e carinho, por tanto acolhimento, por estarem sempre dispostos a pensar junto e a fazer dar certo. Thalita, Mikaella, Bruna, Heloísa, Wanessa, Rafael: vocês foram verdadeiros presentes. Muito obrigada por tudo!

Aos colegas Jamilly, Fagner e Emanuel por se aventurarem junto comigo em novos desafios na bancada.

Aos laboratórios parceiros e professores responsáveis que cederam espaço e me acolheram durante os experimentos: LABI (Profa. Tamí Mott), TecNano (Profa. Camila Dornelas), LBCM (Prof. Daniel Gitaí), LabTCon (Prof. Irinaldo Diniz), LAFA (Prof. Ticiano Gomes), Profa. Sâmia Andrícia, LENAB (Prof. Hugo Juarez), LInQA (Prof. Josué Caririnha), Profa. Salete Smaniotto, Profa. Êurica Adélia.

À ESENFAR, ICBS, IQB.

Ao CNPq, CAPES, Finep e FAPEAL pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de aprendizado.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

*“E de repente, num dia qualquer,
acordamos e percebemos que já podemos lidar
com aquilo que julgávamos maior que nós mesmos.
Porque não foram os abismos que diminuíram,
mas nós que crescemos.”*

Fabíola Simões, escritora.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Estágios de desenvolvimento do *Tribolium castaneum*: ovo, larva, pupa e adulto. 23
- Figura 2 – Ortologia dos genes de espécies de insetos e espécies de vertebrados. A árvore foi construída pelo método de máxima-verossimilhança com utilização dos genomas. 24
- Figura 3 – Mecanismo de hidrólise de Triacilglicerol à ácidos graxos e monoacilglicerol. 26
- Figura 4 – Esquema do processo de digestão e transporte de lipídeos da dieta em insetos. 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 lipídeos. 28
- Figura 5 – Representação dos níveis de expressão relativa de FATP em tecidos de mamíferos. O tamanho crescente da fonte corresponde a intensidades maiores de expressão. *: FATP5 é expressa apenas no fígado e a FATP6 é expressa quase exclusivamente no coração. #: Expressão no endotélio não foi determinada. 33
- Figura 6 – Mudanças nos adipócitos de ratos de linhagem selvagem e ratos *knockout* FATP1. (A) Cortes histológicos de tecido adiposo branco corados com hematoxilina-eosina de ratos linhagem selvagem (S) e ratos *knockout* FATP1 (KO); (B) Diâmetro dos adipócitos dos grupos de animais testados. 34
- Figura 7 – (A) Fragmentos das sequências conservadas de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) e proteínas homólogas, demonstrando as regiões consenso; (B) Árvore filogenética de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) de ratos e humanos. Em (A), o alinhamento foi realizado no programa MultAlin tool. Fatp = *Drosophila*; 35

FATP1, 4 e 6 = humanos; ACS-20 e ACS-22 = *Caenorhabditis elegans*; Fat1p = Leveduras. Resíduos em vermelho e azul correspondem a resíduos com forte consenso (>90%) e fraco consenso (>50%). O motivo I e II correspondem, respectivamente, ao motivo ATP/AMP e ao motivo FATP-ACSVL. Em (B), o alinhamento foi realizado no Clustal e árvore filogenética construída no programa TreeViewPPC. *Homo sapiens* = hs; *Mus musculus* = mm.

Figura 8 – Transporte e atividade Acil-CoA sintase (ACS) de proteínas FATP. AGL = Ácidos graxos livres; AG = Ácidos graxos; CoA = Coenzima A. 37

Figura 9 – Expressão de FATPs em tecidos e linhagens celulares após sinalização por insulina (50nM). - : ausência de expressão; + à +++: aumento da intensidade de expressão. 37

Figura 10 - Curvas de dissociação obtidas dos primers dos genes analisados, geradas pelo programa StepOnePlus™ (Applied Biosystems). 46
(A) TcasFATP; (B) TcasFATPLike; (C) TcasRPS3.

Figura 11 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos de TcasFATPLike e TcasFATP. (*), (:) e (.) indicam identidade, alta similaridade e baixa similaridade, respectivamente. 54

Figura 12 - Fragmentos do alinhamento de seqüências de FATP de diferentes espécies utilizando o ClustalW v.2.0. São mostrados apenas os fragmentos onde há domínios conservados característicos das FATPs. O domínio ATP/AMP está destacado em vermelho e o domínio FATP-ACSVL está destacado em preto. As seqüências de FATP de *T. castaneum* estão destacados em amarelo. ScerFATP1 = *Saccharomyces cerevisiae*; MmusFATP4 = *Mus musculus*; TcasFATPLIKE = *Tribolium castaneum*; BmoriFATP = *Bombix mori*; TcasFATP = *Tribolium castaneum*; DmFATP = *Drosophila melanogaster*; AgFATP = *Anopheles gambiae*. 55

Figura 13 – Árvore filogenética construída utilizando o software MEGA 56

6.0 com o algoritmo Maximum likelihood e bootstrap de 1000 replicações. EjFATP = *Eilema japonica*; AsFATP = *Ascotis selenaria*; BmoriFATP = *Bombix mori*; OsFATP = *Ostrinia scapularis*; TcasFATP = *Tribolium castaneum*; TcasFATPLike = *Tribolium castaneum*; DmFATP = *Drosophila melanogaster*; CqFATP = *Culex quinquefasciatus*; AgFATP = *Anopheles gambiae*; TcasFATPLIKE = *Tribolium castaneum*; MsFATP = *Manduca sexta*; MmusFATP = *Mus musculus*; HsFATP = *Homo sapiens*; RprolACSVL = *Rhodnius prolixus*, AcilCoA Sintase de cadeia muito longa/proteína transportadora de ácido graxo; ScerFATP1 = *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 14 – Expressão relativa de TcasFATP (A) e TcasFATPLike (B) durante os estágios de desenvolvimento de *T. castaneum* por PCR em tempo real. L20 = Larva de 20 dias; P1 = recém pupas; P2 = Pupas; A3 = Adultos de 3 dias. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. *: Significativamente diferentes por teste de ANOVA uma via, $p < 0,0001$. 59

Figura 15: Expressão relativa de TcasFATP (A) e TcasFATPLike (B) em tecidos de larvas de *T. castaneum* por PCR em tempo real. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,001$. 60

Figura 16 – Inibição da expressão do gene TcasFATP pela injeção de dsFATP. **: Significativamente diferente dos valores dos insetos injetados com a mesma quantidade de dsRNA para Mal por teste t, $p < 0,0001$. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. 62

Figura 17 - Efeito na concentração de Triacilglicerol em larvas após injeção de dsFATP (A); Taxas de β -oxidação em larvas após injeção de dsFATP (B). 64

Figura 18 – Peso médio de larvas tratadas com Orlistate (0,1mg/mg de 65

farinha) frente ao grupo controle (A); Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (B). As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA duas vias.

Figura 19 – Quantificação de Triacilglicerol (TAG) em larvas de grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações independentes. **: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,0001$. 67

Figura 20 - Expressão relativa de TcasFATP (A) e TcasFATPLike (B) em larvas de grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,05$. 67

Figura 21 - Expressão relativa de TcasFATP (A) e TcasFATPLike (B) em larvas de grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,05$. 69

Figura 22 - Expressão relativa de TcasIn1 (A), TcasIn2 (B), TcasSK (C) em cabeça de larvas e TcasInR (D) em tecido de larva total. Resultados para grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,05$; **: $p < 0,001$. 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes, número de acesso no NCBI, sequência dos iniciadores desenhados e tamanho dos fragmentos amplificados pelos primers utilizados.	43
Tabela 2 – Análise Bioinformática das sequências de proteínas homólogas a FATP de <i>Tribolium castaneum</i> . As predições foram feitas nos Programas SignalP 4.0 (Peptídeo sinal); TMHMM 2.0, SOSUI, TMpred e HMMTop (Domínio Transmembrana); ProtParam (Peso molecular, Ponto isoeletrico, localização subcelular e nº de aminoácidos); NetPhos 3.1(sítios de fosforilação).	57
Tabela 3 - Análise dos Índices nutricionais da larva do <i>Tribolium castaneum</i> em tratamento com Orlistate após 96h. RGR = Taxa de crescimento relativo, RCR = taxa de consumo relativo, ECI = eficiência da conversão de alimento ingerido. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t e a representação com letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, $p < 0,0001$.	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A3 – Adultos com 3 dias de idade

ACBP – do inglês, *Acyl-CoA binding protein*

ACC – Acetil CoA carboxilase

ACS – Acil CoA sintase

ACSL-1 – Acil CoA sintase de cadeia longa

ACSVL – Acil CoA sintase de cadeia muito longa

AGPAT – 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase

AKH – Hormônio adipocinético

AMP – Adenosina monofosfato

AMPC – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATP – Adenosina trifosfato

BmFATP – Proteína Transportadora de Ácidos Graxos de *Bombyx mori*

CD36 – Transportador de ácidos graxos CD36

cDNA – DNA complementar

CoA – Coenzima A

CS1 – Quitina sintase 1

Ct – do inglês, *Threshold cycle*

DAG – Diacilglicerol

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsRNA – RNA dupla fita

dsMal – RNA dupla fita para o gene da proteína ligadora de manose de *Escherichia coli*

dsFATP – RNA dupla fita para o gene da proteína transportadora de ácidos graxos de *Tribolium castaneum*

ECI – Eficiência de conversão de alimento

FABPm – do inglês, *Fatty Acid Binding Protein Membrane-associated*

FATP – do inglês, *Fatty Acid Transport Protein*

FATP/ACSV – Proteína Transportadora de Ácidos Graxos com atividade intrínseca de Acil-CoA sintase

GLUT-4 – Transportador de glicose 4

GPAT – Glicerol-3-fosfato aciltransferase

GPCRs – Receptores acoplados a proteína Gs

H₂O-DEPC – Água tratada com Pirocarbonato de dietila (DEPC)

HPLC – do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

In1 – Peptídeo semelhante à insulina 1

In2 – Peptídeo semelhante à insulina 2

InR – Receptor de insulina

L10 – Larvas de 10 dias de idade

L15 – Larvas de 15 dias de idade

L20- Larvas de 20 dias de idade

LCFA – do inglês, *Long-Chain Fatty Acids*

LTP – Partícula transferidora de lipídeos

MGAT – Monoacilglicerol-aciltransferase

P1 – Recém pupas

P2 – Pupas

PAP – Fosfatidato fosfolipase

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pI – Ponto isoelétrico

PPAR- α – Receptores ativados por proliferação de peroxissomos tipo α

PPAR- γ – Receptores ativados por proliferação de peroxissomos tipo γ

PPAR- γ /retinoide X – Receptores ativados por proliferação de peroxissomos tipo γ retinoide X

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RCR – Taxa de consumo relativo

RGR – Taxa de crescimento relativo

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SK - Sulfakinina

SLC27 – Carreadores de soluto 27

sn-1,2-DAG – sn-1,2-Diacilglicerol

SNC – Sistema Nervoso Central

TAG – Triacilglicerol

TAG-Lipase – Triacilglicerol-Lipase

TcasFATP – Proteína transportadora de ácidos graxos de *Tribolium castaneum*

TcasFATPLike – Proteína transportadora de ácidos graxos tipo *like* de *Tribolium castaneum*

TcasRPS3 – Proteína Ribossomal 3 de *Tribolium castaneum*

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

VHDL – do inglês, *Very high density lipoprotein*

VLCFA – do inglês, *Very long chain fatty acids*

RESUMO

Os coleópteros constituem uma ordem de insetos bastante conhecidos como besouros. A maioria das espécies de coleóptero são insetos fitófagos e por esta razão constituem importantes pragas de culturas e de armazenamento, como o *Tribolium castaneum*. O metabolismo de lipídeos é importante para as funções biológicas de insetos, exercendo papel na geração de energia metabólica e em outros processos celulares. As proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) exercem papel crucial no transporte de ácidos graxos extracelulares para as células, possuem sequência conservada entre as espécies e estão envolvidas na síntese de hormônios e feromônios. Estudos recentes mostram que o silenciamento do gene para FATPs através de técnicas de RNA de interferência (RNAi) em insetos afetam a absorção de ácidos graxos e a síntese de feromônio. Este trabalho tem como objetivo caracterizar proteínas homólogas à FATPs presentes no genoma de *Tribolium castaneum*, avaliar a expressão gênica nos tecidos, fases de desenvolvimento e em insetos tratados com Orlistate e avaliar o efeito do silenciamento de FATPs no metabolismo energético. Foram realizadas análises bioinformáticas com as sequências de aminoácidos e a avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real. Os efeitos do fármaco Orlistate foram avaliados através de qPCR e análise dos índices nutricionais. A busca de sequências no genoma do *T. castaneum* revelou duas sequências de proteínas homólogas à FATPs e a análise bioinformática foi realizada. O estudo da expressão gênica de FATPs por qPCR demonstrou maior expressão dos dois genes no corpo gorduroso de larvas e expressão considerável em todos os estágios de desenvolvimento do inseto, com maior expressão no estágio de pupa. Os efeitos do Orlistate na expressão das FATPs evidenciaram a influência da composição da dieta na regulação da expressão gênica dessas proteínas. O silenciamento gênico de TcasFATP foi alcançado, mas não foram observados efeitos diretos na dinâmica energética das larvas, pois os níveis de triacilglicerol e as taxas de β -oxidação não foram afetadas. Dessa forma, estudos mais detalhados com uso do silenciamento gênico serão necessários para melhor caracterização funcional das FATPs e elucidação do seu papel no metabolismo energético do inseto.

Palavras-chave: FATP, RNAi, qPCR, lipídeos, *Tribolium castaneum*, Coleoptera

ABSTRACT

Coleoptera is an order of insects well known as beetles. Most coleopteran species are phytophagous insects and for this reason are essential to crop and storage pests such as the *Tribolium castaneum*. Lipid metabolism is vital for the biological functions of insects, playing a role in the generation of metabolic energy and other cellular processes. Fatty acid transport proteins (FATPs) play a crucial role in the transport of extracellular fatty acids to cells, have a conserved sequence between species and are involved in the synthesis of hormones and pheromones. Recent studies show that silencing the gene for FATPs through interfering RNAi techniques (RNAi) in insects affects fatty acid uptake and pheromone synthesis. This work aims to characterize proteins homologous to FATPs present in the genome of *Tribolium castaneum*, to evaluate the gene expression in tissues, developmental stages and insects treated with Orlistat and to evaluate the effect of FATP silencing on energy metabolism. Bioinformatics analyzes were performed with the amino acid sequences, and real-time PCR evaluated the gene expression. The effects of the drug Orlistat were evaluated through qPCR and analysis of nutritional index. The search for sequences in the *T. castaneum* genome revealed two sequences of proteins homologous to FATPs and bioinformatic analysis was performed. The study of the gene expression of FATPs by qPCR demonstrated more significant expression of the two genes in the fat body of larvae and many expressions in all stages of development of the insect, with higher expression in the pupa stage. The effects of Orlistat on the expression of FATPs evidenced the influence of diet composition on the regulation of the gene expression of these proteins. Gene silencing of TcasFATP was achieved, but no direct effects on the energetic dynamics of the larvae were observed since triacylglycerol levels, and β -oxidation rates were not affected. Thus, more detailed studies with the use of gene silencing will be necessary to characterize FATPs better and elucidate their role in insect energy metabolism.

Keywords: FATP, RNAi, qPCR, Lipids, *Tribolium castaneum*, Coleoptera

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Os insetos como modelo experimental	20
2.2 O inseto <i>Tribolium castaneum</i>	22
2.3 Digestão, absorção e transporte de lipídeos em insetos	25
2.4 Transporte de lipídeos entre tecidos	29
2.5 Proteínas Transportadoras de Ácidos Graxos (FATP)	31
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Insetos	41
4.2 Busca de genes FATP no genoma de <i>Tribolium castaneum</i>	41
4.3 Análise Bioinformática	41
4.4 Caracterização da expressão gênica de TcasFATP e TcasFATPlike em tecidos e estágios de desenvolvimento do inseto por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	42
4.4.1 Síntese dos iniciadores	42
4.4.2 Extração de RNA total	44
4.4.3 Dosagem de RNA Total	44
4.4.4 Determinação da eficiência dos iniciadores	45
4.4.5 Determinação da eficiência de amplificação e análise da curva de dissociação	45
4.4.6 PCR em tempo real (RT-qPCR)	46
4.4.7 Análise dos dados do RT-qPCR	47
4.5 Avaliação dos efeitos da injeção de dsRNA para TcasFATP em larvas de <i>T. castaneum</i>	47
4.5.1 Síntese de dsRNA para TcasFATP	48
4.5.2 Injeção de dsRNA para TcasFATP em larvas de <i>T. castaneum</i>	50
4.5.3 Medida de β -Oxidação	50
4.5.4 Quantificação de Triacilglicerol	51
4.6 Avaliação dos efeitos da tetraidrolipstatina (Orlistate®) nos índices	51

nutricionais, sobrevivência, Triacilglicerol e na expressão de FATPs	
4.7 Quantificação de Triacilglicerol (TAG)	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Busca de sequências homólogas à FATP e Análise Bioinformática	54
5.2 Caracterização da expressão gênica de TcasFATP e TcasFATPlike em tecidos e estágios de desenvolvimento por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	58
5.3 Avaliação dos efeitos da injeção de dsRNA para TcasFATP em larvas de <i>T. castaneum</i>	61
5.4 Avaliação dos efeitos da tetraidrolipstatina (Orlistate®) nos índices nutricionais, sobrevivência, Triaglicerídeos e expressão de FATPs	64
6. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO A - Produção não-referente à tese submetida à revista <i>Bioorganic Chemistry</i>	89
ANEXO B - Produção não-referente à tese publicada na Revista <i>Insects</i>	136

1 INTRODUÇÃO

A ordem Coleoptera é considerada a ordem de insetos mais diversa, com espécies que demonstram boa adaptação a nichos ecológicos variados (WOODCOCK et al., 2013). Os coleópteros são popularmente conhecidos como besouros e predominantemente são fitófagos, pois alimentam-se exclusivamente de tecido vegetativo e, por este motivo, são bastante conhecidos como importantes pragas de culturas, causando vastas perdas econômicas para os produtores (RAFAEL et al., 2012). O *Tribolium castaneum* é uma espécie de besouro com coloração castanho avermelhada que é bem conhecido como praga de armazenamento de grãos. O genoma do *T. castaneum* já foi descrito e depositado em banco de dados, o que facilita seu uso em estudos de Biologia Molecular (RICHARDS et al., 2008). A facilidade em trabalhar com suas sequências de aminoácidos e a identificação de muitas proteínas com sequências homólogas à outras espécies tem o colocado como importante modelo experimental nos últimos anos (RICHARDS et al., 2008; YU et al., 2013).

Os insetos são incapazes de sintetizar alguns metabólitos e precisam adquirir esses nutrientes através da alimentação (BEHMER et al., 1999), sendo o triacilglicerol o principal componente lipídico da dieta e a forma em que são estocados os ácidos graxos utilizados para a homeostase energética do inseto (BEENAKKERS et al., 1985). As proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) exercem papel importante no metabolismo energético, pois estão intimamente envolvidas com o transporte e estocagem desses compostos (DOEGE & STAHL, 2006). A família de FATPs apresenta domínios bastante conservados em sua sequência de aminoácidos ao longo das espécies: um domínio de ligação a ATP/AMP e um segundo domínio FATP-ACSVL, envolvido na ligação de ácidos graxos (DIRUSSO et al., 2008). Devido à importância dos lipídeos para o metabolismo de insetos, o estudo da ação de FATPs na mobilização de ácidos graxos e no desenvolvimento do inseto em aspectos moleculares é de suma importância.

Poucas são as informações sobre a função de FATPs em insetos, a maior parte dos estudos demonstram sua expressão nas glândulas de feromônio e discutem seu envolvimento no transporte de ácidos graxos para a síntese de feromônio de agregação (QIAN et al., 2011). A expressão de genes homólogos codificantes para FATPs nos tecidos de *T. castaneum* ainda não foi demonstrada na literatura, nem o seu envolvimento na transferência de lipídeos nos enterócitos e no corpo gorduroso, revelando uma lacuna a ser compreendida.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os insetos como modelo experimental

Os insetos representam um dos grupos mais importantes do reino animal, quer sob o aspecto econômico, ou sob o aspecto médico (LEHANE, 1991). A classe Insecta constitui o grupo mais numeroso dos artrópodes e compreende cerca de 70% de todas as espécies animais conhecidas e é a classe que maior sucesso evolutivo obteve dentre as espécies eucarióticas. Um dos fatores que contribuíram para o seu sucesso foi o fato de manterem um ciclo de vida altamente especializado, onde adultos e larvas se desenvolvem, em sua grande maioria, com hábitos alimentares diferentes. Um fator que contribuiu muito para o sucesso adaptativo do grupo foi, sem dúvida, a presença de asas, que possibilitou a conquista dos ambientes mais diversos. Esta característica lhes permitiu uma maior eficiência na busca do alimento e defesa contra predação, além de garantir o fluxo gênico das espécies através da migração (MARANHÃO, 1977). Além disso, muitas espécies de insetos se reproduzem facilmente e apresentam um ciclo de vida curto, que pode ser acompanhado em todas as fases, possibilitando com isso, um bom modelo para o desenvolvimento de ensaios experimentais. Os insetos têm outra vantagem em relação aos outros grupos, são pequenos e apresentam órgãos que podem ser facilmente manipulados.

Por apresentarem maior resistência a intervenções cirúrgicas, devido ao fato de não necessitarem sofrer incubação para irrigação com oxigênio; por possuírem um sistema nervoso menos complexo, entre outras características, os insetos constituem um grupo de escolha para diversos tipos de estudos dentre eles, genéticos, bioquímicos, celulares e moleculares (GRILLO, 2005). Alguns estudos utilizando insetos como modelo geraram descobertas que podem ser aplicadas aos vertebrados. A descoberta do mecanismo de ação dos hormônios esteroides iniciou-se com a descrição da ação da ecdisona, um hormônio esteroide de insetos, que estimulava a síntese *de novo* de RNA no núcleo das células (KARLSON, 1963). 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) e a descoberta dos genes “Homeobox”, responsáveis por determinar o padrão de organização dos eixos corporais (AKAM, 1989). Também em *D. melanogaster*, estudos genéticos e moleculares no sistema nervoso central (SNC) apontaram os locais relevantes para

comportamentos sexuais masculinos (DEMIR & DICKSON, 2005; SAKAI & KITAMOTO, 2006).

Estudos envolvendo sequenciamentos e estudos de clonagem têm fornecido dados importantes a respeito da sequência do genoma e informações sobre a estrutura genética de receptores em invertebrados. A descoberta de receptores é de grande valia para a compreensão de mecanismos farmacológicos. Em insetos, a ampla sequência de um grupo de receptores de neurotransmissores/neuro-hormonais foi descoberta, são receptores de aminas biogênicas acoplados à proteína G (GPCRs), porém ainda são poucas as informações sobre o mecanismo farmacológico envolvido (VLEUGELS et al., 2014). Em *Tribolium castaneum*, através de técnicas de biologia molecular, 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). Também em *T. castaneum*, estudos demonstraram a importância deste inseto como modelo experimental na avaliação do efeito de fatores dietéticos encontrados nos brócolis na expressão de genes homólogos envolvidos na resistência ao estresse e responsáveis pelos efeitos sobre a longevidade, como os genes Nrf-2, Jnk-1 e Foxo-1 (GRÜNWALD et al., 2013).

O inseto *Rhodnius prolixus* foi um dos primeiros modelos utilizados para estudo do metabolismo em artrópodes. O inseto hematófago é o principal vetor da Doença de Chagas (LENT & WYGODZYNSK, 1979), que o coloca como importante alvo para estudos devido à sua importância médica. A maior parte das informações acerca do metabolismo energético em insetos foi descoberta através do estudo deste modelo. O mecanismo de distribuição de lipídeos através da lipoproteína Lipoforina é bem elucidado em insetos e muitos estudos envolvendo o receptor de Lipoforina nos enterócitos, utilizando o *R. prolixus* como modelo, revelaram a importância destas estruturas para uma captação eficaz dos lipídeos da dieta e desenvolvimento do inseto (GONDIM & WELLS, 2000; GRILLO et al., 2003). O *R. prolixus* teve seu genoma sequenciado (MESQUITA et al., 2015), o que tem permitido o estudo dos mecanismos adaptativos do inseto e novos alvos para controle biológico.

Um estudo com *Rhynchophorus ferrugineus* obteve sucesso na descoberta do transcriptoma durante a fase embrionária deste inseto, onde foram identificadas as sequências de 22.532 genes de um total de 26.581 genes ativos durante a embriogênese (YIN et al., 2013). Com esses estudos, os autores dividiram a embriogênese de *R. ferrugineus* em 5 estágios de desenvolvimento, fornecendo informações de quais proteínas eram mais expressas em cada fase. Kunieda et al. (2006) sequenciaram o genoma da abelha *Apis mellifera* e avaliaram quais genes estavam envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos desse

inseto, comparando com o genoma de outros insetos que possuem alimentação diferente (*Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae*), fornecendo informações sobre alterações de genes através da evolução. Os resultados encontrados mostraram uma grande semelhança entre os genes codificantes de enzimas do metabolismo de lipídeos e carboidratos, porém foram observadas taxas de alterações significativas entre os genes das espécies, quando se tratando dos genes envolvidos na glicólise e gliconeogênese, principalmente nas enzimas hexoquinase e piruvato-quinase. Poucas alterações no número de genes das vias de síntese e metabolismo de ácidos graxos e cetogênese foram identificadas.

Estudos envolvendo a descoberta de genomas de insetos tem obtido sucesso e colocado estes artrópodes como importantes modelos de estudo, principalmente para estudos envolvendo biologia molecular. O inseto *T. castaneum*, mais importante modelo artrópode e de praga agrícola, teve seu genoma publicado em 2008 (RICHARDS et al., 2008), o que tem resultado em grande número de estudos envolvendo genes homólogos à genes em humanos. Yu et al. (2013) caracterizaram em *T. castaneum* a presença de neuropeptídeos homólogos aos neuropeptídeos em mamíferos gastrina/colecistoquinina, elucidando aspectos envolvidos no controle da ingestão de alimentos. Além disso, a disponibilidade da sequência genética de *T. castaneum* permitiu também o estudo sobre o envolvimento do gene quitina sintase 1 (CS1) na maior resistência desta praga agrícola à fungos entomopatogênicos (HAYAKAWA et al., 2017). 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). 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.

2.2 O inseto *Tribolium castaneum*

O *Tribolium castaneum* é uma das principais pragas de grãos armazenados com distribuição mundial, responsável por grandes perdas econômicas neste setor de produtos. A espécie pertence à ordem Coleoptera e família Tenebrionidae e são popularmente conhecidos como besouro vermelho da farinha, por apresentarem uma coloração castanho-avermelhada (Figura 1). A família Tenebrionidae engloba mais de 10.000 espécies, sendo 100 delas caracterizadas como pragas secundárias de produtos alimentícios armazenados. O *T.*

castaneum é considerado uma praga de produtos armazenados de grande importância, principalmente de cereais como milho, arroz e trigo (FARONI & FRABETTI, 2009).

O *T. castaneum* é um inseto holometábolo, que passa por metamorfose completa em seu desenvolvimento, seu ciclo de vida compreende de 30 a 40 dias, quando em temperatura favorável de 35°C e umidade relativa do ar de 70% (BERNARDO QUÍMICA, 2006). Os ovos de *T. castaneum* medem aproximadamente 0,6 x 0,3 mm de comprimento, são claros e recobertos por uma camada de substância viscosa e o período para eclosão é de cerca de 5-7 dias. Cada fêmea pode ovipositar cerca de 450 ovos a cada ciclo (BERNARDO QUÍMICA, 2006).

As larvas de *T. castaneum* são cilíndricas, amareladas, medem cerca de 7mm e possuem o último segmento abdominal com uma bifurcação. As larvas passam por 6 a 8 ínstaes até chegarem à fase de pupa. O estágio de pupa de *T. castaneum* dura cerca de 7 dias (Figura 1) (GALLO et al., 2002). Já os insetos adultos de *T. castaneum*, apresentam coloração castanho-avermelhada, medem cerca de 3-4 mm, possuem corpo achatado e duas depressões transversais na cabeça (ELIAS et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1 – Estágios de desenvolvimento do *Tribolium castaneum*: ovo, larva, pupa e adulto.



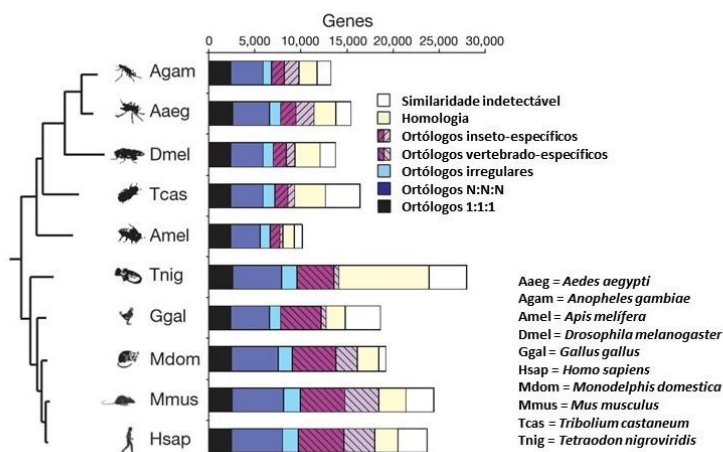
Fonte: <http://grainscanada.gc.ca> – Acesso em 22 de Junho de 2017.

Esta espécie acomete principalmente grãos moídos e conseguem se desenvolver bem em ambientes e alimentos extremamente secos. Essa capacidade se deve à presença em sua estrutura de Túbulos de Malpighi dispostos em um sistema criptonefridial altamente desenvolvido, onde os túbulos estão inseridos no reto e permitem a reabsorção quase completa da água. Esta adaptação dos Túbulos de Malpighi permitem uma perfeita osmorregulação e seu grande potencial adaptativo tem justificado a alta resistência observada para a maioria dos inseticidas. Muitos genes duplicados foram observados em *T. castaneum*,

principalmente em genes da subfamília CYP450, CYP6 e CYP9, e esta duplicação está relacionada à maior resistência à inseticidas em dípteros (DABORN et al., 2005). Cerca de 152 genes duplicados em *Tribolium* apresentam-se como cópia única em outras espécies de insetos como *D. melanogaster*, essa duplicação é indicativo de neo-funcionalização espécie-específica (CICCARELLI et al., 2005; RICHARDS et al., 2008).

O *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. Possui 16.404 genes identificados e suas sequências apresentam intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos. Cerca de 7.579 genes, aproximadamente 47% dos genes de *T. castaneum*, demonstram relações ortólogas rastreáveis entre insetos e vertebrados, como esquematizado na Figura 2, onde são observados porcentagens relativas de Ortólogos N:N:N em espécies de vertebrados e invertebrados, representando a presença de genes com múltiplas cópias em todas as espécies. *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. A facilidade na incorporação de fatores nutricionais na alimentação de *Tribolium* 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).

Figura 2 – Ortologia dos genes de espécies de insetos e espécies de vertebrados. A árvore foi construída pelo método de máxima-verossimilhança com utilização dos genomas.



Fonte: Adaptado de RICHARDS et al., 2008.

Os efeitos observados do RNA de interferência (RNAi) em *T. castaneum* são sistêmicos e permitem o silenciamento de genes em tecidos específicos e estágios de desenvolvimento por injeção de RNA dupla fita (dsRNA) (RICHARDS et al., 2008).

2.3 Digestão, absorção e transporte de lipídeos em insetos

Informações descritas na 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; GRILLO et al., 2007). Os insetos são incapazes de sintetizar alguns metabólitos e precisam adquirir outros nutrientes através da alimentação (BEHMER et al., 1999), sendo o triacilglicerol o principal componente lipídico da dieta e a forma em que são estocados os ácidos graxos utilizados para a homeostase energética (BEENAKKERS et al., 1985).

A digestão, absorção e transporte dos lipídeos da dieta em insetos ocorre, essencialmente, no intestino médio (TURUNEN & CRAILSHEIM, 1996). Atualmente, são considerados dois possíveis modelos de digestão de lipídeos em insetos:

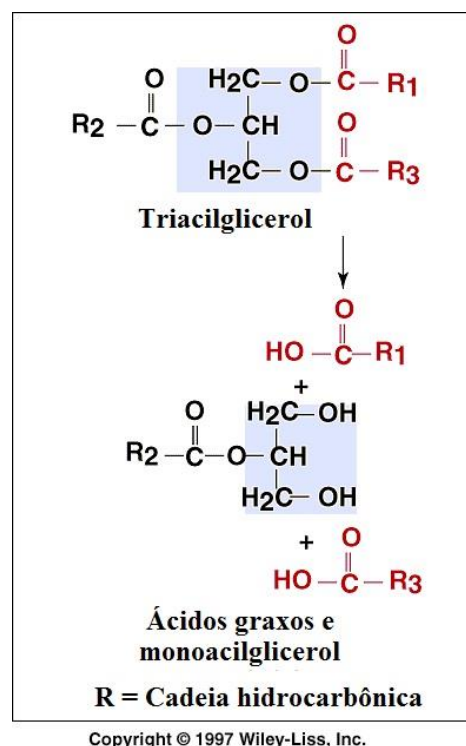
- Completa hidrólise de triacilglicerol a ácidos graxos e glicerol (WEINTRAB & TIETZ, 1973; TSUCHIDA & WELLS, 1988);
- Hidrólise de triacilglicerol gerando monoacilgliceróis e ácidos graxos (HOFFMAN & DOWNER, 1979) (Figura 3).

Os dois modelos foram propostos por pesquisas que utilizaram a marcação de produtos da digestão com materiais radioativos. A hidrólise dos triacilgliceróis provenientes da dieta por ação da TAG-lipase geram ácidos graxos que serão absorvidos através do epitélio do intestino médio. Sabe-se que a absorção de ácidos graxos é bastante eficiente, mas não é bem compreendida quanto à forma como o transporte através dos enterócitos é realizada (TSUCHIDA & WELLS, 1988; ARRESE et al., 2001; CANAVOSO et al., 2001). A atividade Triacilglicerol-lipase e absorção de ácidos graxos pelos enterócitos já é bem descrita no inseto *Rhodnius prolixus* (GRILLO et al., 2007).

Os lipídeos absorvidos através das membranas dos enterócitos irão entrar em rotas metabólicas específicas, a depender da demanda energética da célula. Os ácidos graxos de cadeia longa, ainda nos enterócitos, 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 et al., 2014; ALVES-BEZERRA et al., 2016). Em insetos, ainda não está esclarecido se esta ativação é realizada por proteínas transportadoras que possuem atividade intrínseca de acil-CoA sintase (FATP/ACSVL) ou se esta ativação ocorre por ACS citoplasmáticas (DOURLIN et al., 2015; ALVES-BEZERRA et al., 2016).

Figura 3 – Mecanismo de hidrólise de Triacilglicerol à ácidos graxos e monoacilglicerol.



Fonte: Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas, THOMAS DEVLIN, 5ª edição.

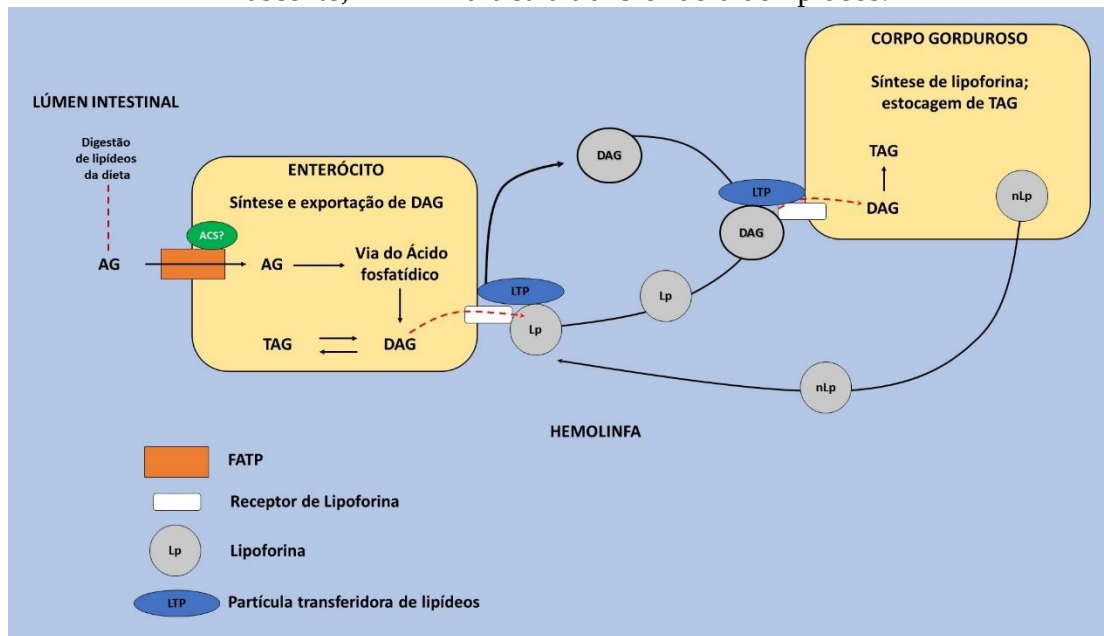
Algumas isoformas de ACS foram identificadas e clonadas em *D. melanogaster*, mas pouco se sabe do seu mecanismo e envolvimento no metabolismo (OBA et al., 2005). Após serem ativados, os acil-CoAs precisam estar ligados a proteínas ligadoras de acil-CoA (ACBP) dentro das células. Estudos com *R. prolixus* mostram que quanto maior a ingestão de dieta rica em lipídeos, maior a quantidade de acil-CoA ligado às ACBPs, evidenciando a necessidade de os lipídeos da dieta serem direcionados à ativação por Coenzima A e ligação às ACBPs para que possam ser metabolizados pelas células (ALVES-BEZERRA et al., 2010).

O acil-CoA produzido nos enterócitos pode ser direcionado para a síntese de triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG) e fosfolipídeos, ou podem ser utilizados

imediatamente no local ou exportados para outro órgão a depender da demanda energética (GREVENGOED et al., 2014). Estudos *in vivo* e *in vitro* em diferentes ordens de insetos demonstraram que o DAG é o principal lipídeo presente na hemolinfa após a digestão (CANAVOSO & WELLS, 2000; GRILLO et al., 2007). A conversão dos produtos da digestão em diacilglicerol pode ocorrer pela via do ácido fosfatídico (síntese *de novo* a partir de glicerol 3-fosfato) ou pela via do Monoacilglicerol por acilação estereoespecífica de 2-monoacilglicerol (ALVES-BEZERRA & GONDIM, 2012). Estas duas vias são as mesmas utilizadas por mamíferos, porém, ao contrário do que ocorre em mamíferos, a via do ácido fosfatídico é a predominante no metabolismo dos insetos (ALVES-BEZERRA & GONDIM, 2012). Em buscas no genoma de *Rhodnius prolixus*, não foi identificado nenhum gene codificante para Monoacilglicerol-aciltransferase (MGAT), enzima central na via do Monoacilglicerol. Enquanto as buscas por genes codificantes das enzimas Glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT) e Fosfatidato fosfohidrolase (PAP), enzimas centrais da via do ácido fosfatídico, obtiveram resultados positivos e tiveram seu perfil transcricional confirmados por qPCR (ALVES-BEZERRA & GONDIM, 2012). Em larvas de borboleta *Pieris brassicae*, foi observado que o glicerol consumido da dieta foi utilizado nas células do intestino médio para a síntese de sn-1,2-DAG, indicando a atuação pela via do ácido fosfatídico (TURUNEN, 1993). Também em *M. sexta*, estudos mostraram que a síntese de DAG é realizada pela via do ácido fosfatídico, sem contribuição da via do monoacilglicerol (CANAVOSO & WELLS, 2000).

Sugere-se que os ácidos graxos absorvidos são transportados na forma de DAG e são posteriormente convertidos em triacilglicerol, funcionando como reserva de lipídeos de onde o diacilglicerol será liberado para a hemolinfa para utilização a depender das necessidades energéticas (MAJEROWICZ, 2009; GRILLO et al., 2007). Este mecanismo assegura a absorção máxima de ácidos graxos a partir do lúmen, contribui para a manutenção de uma baixa concentração intracelular de DAG, o qual pode ser tóxico em altas concentrações (Figura 4). Um estudo com *M. sexta* demonstrou que o DAG é realmente o lipídeo presente em maior quantidade na hemolinfa. Através da marcação dos lipídeos da dieta com trioleína, o autor encontrou mais de 90% do marcador ligado à DAG na hemolinfa do inseto. Além disso, mais de 70% do marcador foi encontrado, após 4 horas, no corpo gorduroso do inseto na forma de TAG (TSUCHIDA & WELLS, 1988). Este fato confirma a hipótese proposta para a digestão em insetos, de que os lipídeos da dieta são hidrolisados, absorvidos, ativados e convertidos em DAG e transportados pela hemolinfa até sua estocagem no corpo gorduroso, onde são imediatamente reconvertidos à TAG.

Figura 4 – Esquema do processo de digestão e transporte de lipídeos da dieta em insetos. 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 lipídeos.



Fonte: Autor, 2018.

Estudos em vertebrados demonstram a participação de três grupos de proteínas na absorção dos lipídeos: proteínas ligadoras de ácido graxo associadas à membrana (FABPpm), proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) e transportador de ácidos graxos (CD36). Essas proteínas possuem alta afinidade por ácidos graxos e a expressão de proteínas semelhantes já foi identificada em insetos como *Manduca sexta*, *Bombix mori*, *Drosophila melanogaster*, *Eilema japonica* (NIOT et al., 2009; SMITH et al., 1992; DOURLLEN et al., 2012; QIAN et al., 2011). Já foram descritas sequências de genes codificantes para proteínas transportadoras de ácidos graxos em *Aedes aegypti* (SANDERS et al., 2003) e *B. mori* (OHNISHI et al., 2009). Proteínas semelhantes a CD36 também já foram identificadas em alguns insetos, como em *B. mori*, *D. melanogaster*, *A. aegypti* e *Tribolium castaneum* (NICHOLS & VOGT, 2008), mas detalhes sobre o seu envolvimento no mecanismo de transporte ainda não foram esclarecidos.

Além dos lipídeos adquiridos diretamente da dieta, os ácidos graxos também podem ser sintetizados dentro das células através de um processo chamado síntese *de novo*, a partir de precursores glicídicos. Em mamíferos essa via alternativa é ativada principalmente no fígado, mas também em menor proporção no tecido adiposo. Neste caso, a síntese *de novo* de ácidos graxos é ativada pelo excesso de carboidratos, que são convertidos primeiramente à

citrato e depois à acetil-CoA por ação da enzima ATP-citrato liase. Após essa etapa, o acetil-CoA é convertido à malonil-CoA através de uma carboxilação por ação da enzima acetil-CoA carboxilase. O malonil-CoA sofre então ação da enzima ácido graxo sintase, que catalisará as reações de conversão à palmitoil-CoA (AMEER et al., 2014). Em insetos, poucas informações estão disponíveis sobre a presença e contribuição da via de síntese *de novo* na homeostase lipídica, mesmo já havendo estudos que identificaram a atividade de enzimas envolvidas nesta via, como a acetil-CoA carboxilase (ACC) na mosca *Glossina morsitans*, *A. aegypti* e *Rhodnius prolixus* (GOLDRING & READ, 1994; ALABASTER et al., 2011; SARAIVA, 2015).

2.4 Transporte de lipídeos entre tecidos

Os ácidos graxos da dieta são convertidos em diacilglicerol e 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, que é sintetizada no corpo gorduroso (BEENAKKERS et al., 1985; CHINO et al., 1981). De forma contrária ao que ocorre nos vertebrados, onde lipoproteínas são empacotadas com classes lipídicas para transportar os lipídeos da dieta, nos insetos os lipídeos são adicionados diretamente à lipoforina já presente na hemolinfa (CHINO, 1985; SOULAGES & WELLS, 1994). A lipoforina é carregada no intestino e circula pela hemolinfa, transportando-os até outros órgãos, como o corpo gorduroso, onde eles são descarregados e estocados. Ela também transporta os lipídeos já estocados no corpo gorduroso para os sítios de utilização. O principal lipídeo transportado é o diacilglicerol, mas colesterol, hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, carotenoides e fosfolipídeos também podem ser transportados (CHINO & GILBERT, 1971; GONDIM et al., 1989). A lipoforina não é endocitada por nenhum tecido; após liberar os lipídeos para estoque no corpo gorduroso, sua função de transporte é restabelecida (TSUCHIDA & WELLS, 1988; SOULAGES & WELLS, 1994). A depender do estágio de desenvolvimento do inseto e da demanda energética do organismo, a lipoforina pode apresentar diferentes densidades: LDLp (lipoforina de baixa densidade), HDLp (Lipoforina de alta densidade) e VHDLp (lipoforina de densidade muito alta) (BEENAKERS et al., 1985). Estudos bioquímicos e imunocitoquímicos em larvas de *Aeschna cyanea*, uma espécie de libélula, confirmam a hipótese de que a lipoforina não é endocitada por células intestinais durante seu carregamento (BAUERFEIND & KOMNICK, 1992). Uma das particularidades do metabolismo de lipídeos em insetos é a especificidade da lipoforina para o tecido de

entrega. A mesma lipoproteína pode fazer a entrega de DAG para o corpo gorduroso, ou transportar mais hidrocarbonetos para a cutícula de *M. sexta*, a depender da situação metabólica, suportando as hipóteses de que há a presença de um receptor para a lipoforina envolvida no processo de transferência nos tecidos (ARRESE et al., 2001; GRILLO et al., 2007).

A distribuição de lipídeos realizada pela lipoforina, tanto para o corpo gorduroso como para outros órgãos é bem descrita em insetos. A transferência de lipídeos inicia-se por ligação da lipoforina a um receptor específico nos enterócitos, onde os lipídeos são carregados na lipoforina por auxílio de uma partícula transferidora de lipídeos (LTP) (SOULAGES & WELLS, 1994; BLACKLOCK & RYAN, 1994; GOLODNE et al., 2001). Essa transferência dos lipídeos ocorre na superfície das células, sem que ocorra endocitose da proteína transportadora (GONDIM et al., 1989; CANAVOSO & WELLS, 2001; GRILLO et al., 2003; PONTES et al., 2002). Gondim e Wells (2000) caracterizaram a interação da lipoforina com receptores em células intestinais de larvas de *M. sexta* utilizando preparações de membrana. Em *M. sexta*, uma proteína de membrana com atividade característica de ligação à lipoforina foi identificada no corpo gorduroso das larvas. Após processos de purificação, esse suposto receptor foi isolado e identificado como uma proteína de 120 kDa (TSUCHIDA & WELLS, 1990). Em *R. prolixus*, HDLp foi purificada da hemolinfa do inseto e utilizada em ensaios de ligação utilizando preparações de membrana do corpo gorduroso, os resultados demonstraram a interação da lipoforina com sítios de ligação específicos na superfície celular. Também foi observado em ensaios de competição que a lipoforina purificada de *Manduca sexta* foi capaz de se ligar aos sítios de ligação das preparações de membrana de *R. prolixus*, o que sugere que o mecanismo de ligação da lipoforina é conservado entre as espécies de insetos (PONTES et al., 2002).

A participação da partícula transferidora de lipídeos (LTP) tem sido descrita como de grande importância nessa transferência. A LTP é uma lipoproteína de densidade muito alta (VHDL) que já foi isolada a partir da hemolinfa de várias espécies (BLACKLOCK & RYAN, 1994; RYAN et al., 1986) e sua função está relacionada, provavelmente, com a redistribuição de lipídeos entre lipoforinas e entre lipoforina e as membranas dos tecidos (ARRESE et al., 2001; RYAN & VAN DER HORST, 2000). Sendo assim, o destino final do transporte dos lipídeos da dieta é a estocagem no corpo gorduroso. O corpo gorduroso funciona nos insetos como um tecido de função análoga à do fígado e do tecido adiposo em vertebrados, sendo responsável pela síntese da maior parte das lipoproteínas presentes na hemolinfa e o principal sítio de estocagem de glicogênio (BEENAKKERS et al., 1985).

Durante os estados de alta demanda energética, os lipídeos estocados são muito importantes porque custeiam processos metabólicos de alto gasto de energia, como durante o processo de ovogênese, onde altos níveis de energia são requeridos para suportar o desenvolvimento do embrião. Nos ovos, a maior parte dos lipídeos está estocado na forma de TAG (ZIEGLER & VAN ANTWERPEN, 2006; SANTOS et al., 2011), sendo a maior parte da reserva lipídica oriundos da captação de lipídeos da dieta pela lipoforina. Corpo gorduroso e ovários possuem a capacidade de fazer síntese *de novo* de ácidos graxos, mas dados mostram que os ovários possuem baixa capacidade (LORENZ & ANAND, 2004; ZIEGLER & VAN ANTWERPEN, 2006).

Nas situações de alta demanda energética a maioria dos lipídeos estocados no corpo gorduroso são mobilizados para a β -oxidação. Os lipídeos estocados no corpo gorduroso na forma de triacilglicerol (TAG) são mobilizados pela ação da enzima Triacilglicerol-lipase (TAG-lipase) que libera como produto o DAG que será transportado pela lipoforina até os órgãos para β -oxidação e utilização imediata. A ativação da enzima TAG-Lipase geralmente ocorre por sinalização pelo hormônio adipocinético (AKH) (ALVES-BEZERRA et al., 2015). O hormônio adipocinético é um neuropeptídeo que regula o metabolismo energético de insetos em condições de alta demanda energética e durante o jejum, estimulando a circulação de DAG e trealose na hemolinfa para distribuição entre tecidos. O AKH se liga ao seu receptor específico acoplado à proteína G que está localizado na superfície das células do corpo gorduroso e ativa a cascata de reações que resultam no aumento das concentrações de AMPc e cálcio intracelular, ativando a TAG-lipase (GÄDE & AUERSWALD, 2003). Os efeitos da sinalização pelo hormônio adipocinético já foram descritos em várias espécies de insetos, onde o aumento nos níveis circulantes de DAG foi observado após a sinalização por AKH (ARRESE et al., 1996; GÄDE et al., 2006; CANAVOSO et al., 2001). Assim, os lipídeos mobilizados do corpo gorduroso na forma de DAG são direcionados para os tecidos para sofrerem β -oxidação.

2.5 Proteínas Transportadoras de Ácidos Graxos (ACSVL/FATP)

As proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) pertencem à família de carreadores de soluto 27 (SLC27), são proteínas de membrana que facilitam o transporte de ácidos graxos de cadeia longa (LCFA) para o citoplasma, compostos que são a principal fonte de energia das células. Mais de 90% dos LCFAs da dieta são absorvidos por vias mediadas por proteínas, como as FATPs (RICHERI & KLEINFELD, 1995). Como essas proteínas

também são encontradas em membranas internas de células, como as enzimas da família ACS (Acil-CoA Sintetase), e a maioria delas ativa ácidos graxos de cadeia longa, elas têm sido renomeadas na literatura, nos últimos anos, como ACSVL (Acil-CoA Sintetase de cadeias muito longas, do inglês “*Very-long chain Acyl-CoA Synthetases*”). Usualmente, as proteínas transportadoras de ácidos graxos têm sido mencionadas como ACSVL/FATP ou FATP, neste texto essas proteínas serão mencionadas como FATP. Em mamíferos são 6 isoformas de FATPs (6 membros SLC27) já identificadas, com distribuições teciduais específicas e padrões de expressão diferentes entre os tecidos, que evidenciam o envolvimento de cada isoforma na homeostase lipídica em pontos distintos do metabolismo (Figura 5) (ANDERSON & STAHL, 2013). Estudos utilizando sistemas de modelo *knockout* gene-específico demonstram a especificidade de cada isoforma de FATP e revelam que não há compensação do transporte por outra FATP caso uma isoforma seja deletada (RICHERI & KLEINFELD, 1995). As ACSVLs/FATPs facilitam o transporte de ácidos graxos de cadeia muito longa através das membranas e auxiliam no processo de canalização desses ácidos graxos em excesso para vias metabólicas específicas, a depender das necessidades celulares. Ao facilitar o transporte e ao mesmo tempo ativar os ácidos graxos à Acil-CoA, essas proteínas exercem papel importante no direcionamento metabólico unidirecional, ao aprisionar o Acil-CoA formado dentro das células, comprometendo-os à uma via metabólica específica (GREVENGOED et al., 2014; ZHAN et al., 2012). Essa função de canalização das FATPs ocorre, geralmente, devido à formação de complexos multienzimáticos entre essas proteínas de membrana e outras enzimas da célula, como com a Carnitina-Palmitoil transferase 1 (CPT-1). A formação desse complexo enzimático entre FATP e CPT-1, por exemplo, direciona os ácidos graxos de cadeia muito longa para a β -oxidação mitocondrial. As FATPs podem interagir com outras enzimas e canalizar os ácidos graxos de cadeia muito longa para a síntese de Triacilglicerol ou de fosfolípidos, a depender das necessidades celulares (GREVENGOED et al., 2014; SRERE, 1987; MIHALIK et al., 2002).

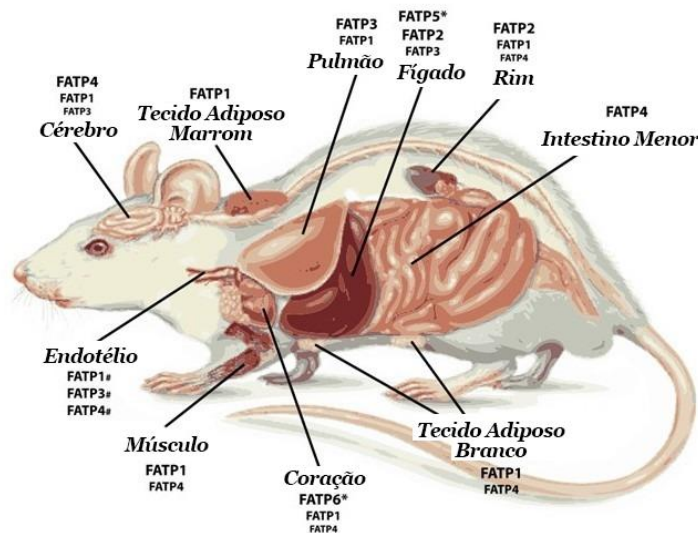
Em mamíferos, a FATP1 é o membro da família FATP mais expresso no tecido adiposo, mas também apresenta expressão no músculo esquelético e no coração. Já a FATP2 é predominantemente expressa no fígado e rins, enquanto a FATP3 encontra-se mais expressa no pulmão e no fígado. A FATP4 é a única isoforma expressa no intestino menor, exercendo função importante na captação de lipídeos da dieta, além de transportar preferencialmente ácidos graxos de cadeia longa como palmitato, oleato e linolato (ANDERSON & STAHL, 2013; STAHL et al., 1999). A isoforma 5 de FATP é expressa exclusivamente no fígado e estudos com deleção de FATP5 em ratos demonstraram falha nas reações de conjugação dos

ácidos biliares, enquanto a FATP6 apresenta-se expressa somente no músculo cardíaco (Figura 5) (ANDERSON & STAHL, 2013).

Doenças relacionadas à obesidade estão intimamente ligadas ao influxo anormal de LCFA pelo tecido adiposo por um transporte mediado por proteínas (STAHL et al., 2002). A absorção anormal de LCFA por tecidos como coração, fígado e músculo levam ao acúmulo de lipídeos que ocasionam aumento dos níveis plasmáticos de triacilglicerol, resistência à insulina e injúrias hepáticas (MEIRHAEGHE et al., 2000; GERTOW et al., 2004; AUINGER et al., 2010; KAZANTZIS & STAHL, 2011).

Figura 5 – Representação dos níveis de expressão relativa de FATP em tecidos de mamíferos. O tamanho crescente da fonte corresponde à intensidades maiores de expressão. *: FATP5 é expressa apenas no fígado e a FATP6 é expressa quase exclusivamente no coração.

#: Expressão no endotélio não foi determinada.

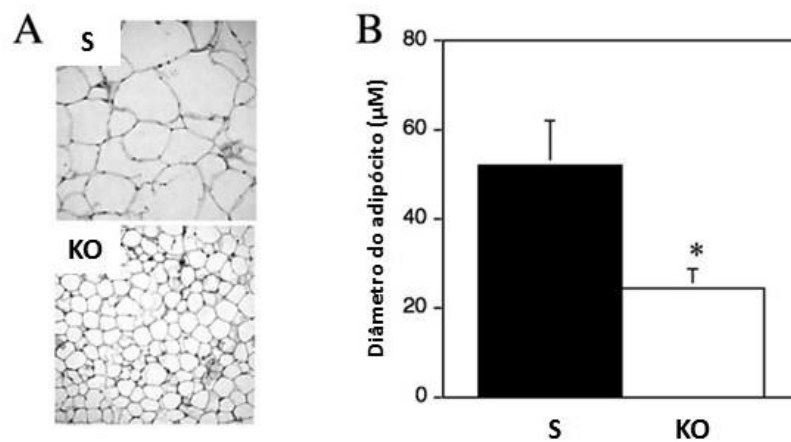


Fonte: Adaptado de ANDERSON & STAHL, 2013.

Por estarem associadas à diversas desordens lipídicas e no transporte de LCFAs, a família de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) constituem importante alvo terapêutico para estas desordens (KAZANTZIS & STAHL, 2011). A FATP1 de mamíferos está localizada, principalmente, na membrana das células adiposas do tecido adiposo marrom e estudos com ratos *knockout* para o gene FATP1 demonstram a diminuição acentuada da absorção de ácidos graxos de cadeia longa que resultam em diminuição do tamanho dos adipócitos, caracterizando a função de FATP1 neste tecido (Figura 6) (WU et al., 2006).

As FATPs possuem pelo menos um domínio transmembranar (LEWIS et al., 2001), apresentam peso molecular entre 63-80kDa (LEWIS et al., 2001) e sequências altamente conservadas entre as espécies, como insetos, leveduras e humanos (Figura 7A) (DOURLEN et al., 2015).

Figura 6 – Mudanças nos adipócitos de ratos de linhagem selvagem e ratos *knockout* FATP1. (A) Cortes histológicos de tecido adiposo branco corados com hematoxilina-eosina de ratos linhagem selvagem (S) e ratos *knockout* FATP1 (KO); (B) Diâmetro dos adipócitos dos grupos de animais testados.



Fonte: Adaptado de WU et al., 2006.

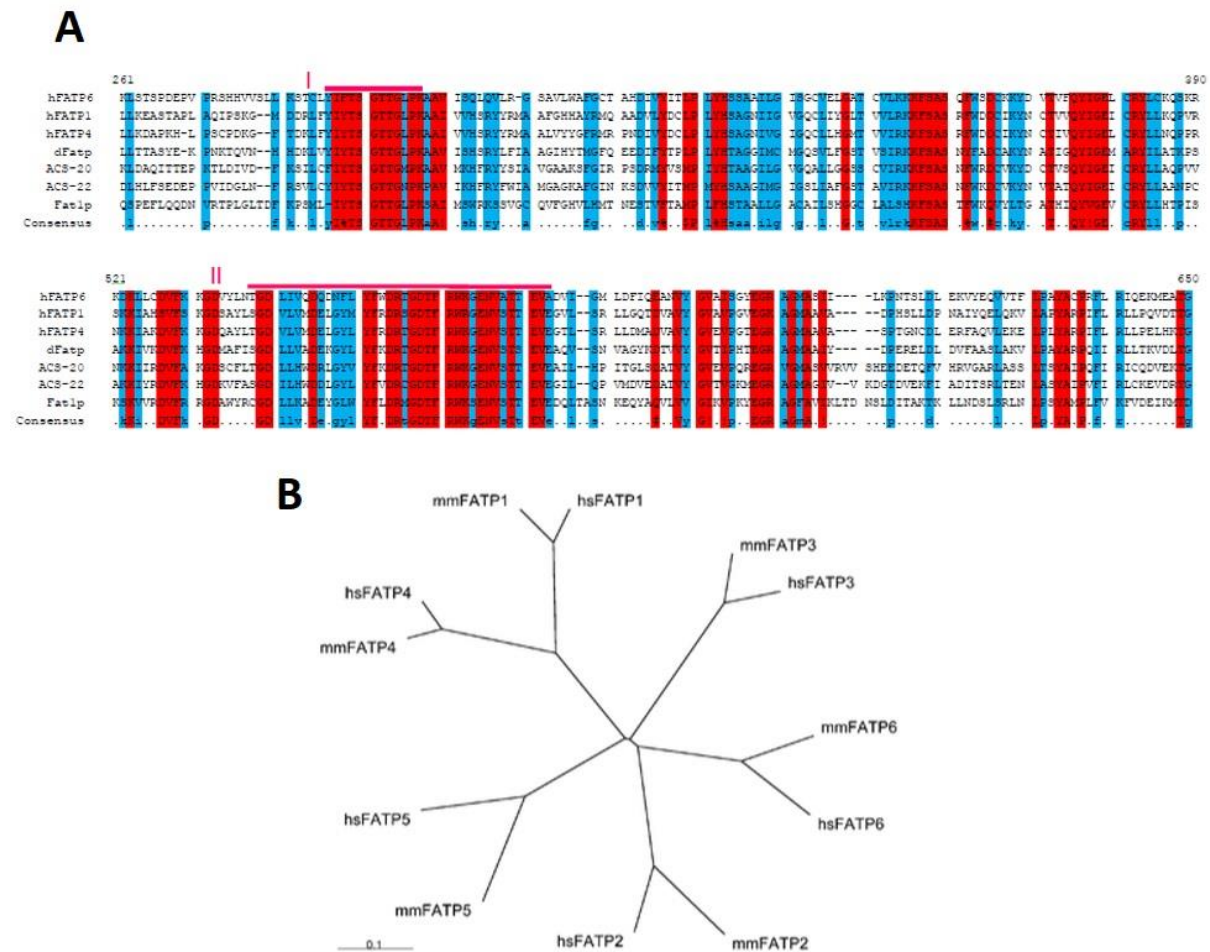
Tanto em vertebrados como em invertebrados, os membros da família FATP apresentam perfis de expressão tecido-específicos (DOURLEN et al., 2015). Em insetos, as FATPs de *Drosophila melanogaster* (a espécie possui três membros da família FATP) apresentam maior expressão no intestino e corpo gorduroso. A expressão destes genes em insetos adultos de *D. melanogaster* é moderada quando comparada ao estágio larval (DOURLEN et al., 2015). Entre mamíferos, as sequências de FATP apresentam grande similaridade (Fig. 7B).

Os membros da família FATP são altamente conservados entre as espécies, com uma sequência de assinatura já conhecida com aproximadamente 311 aminoácidos. Esta sequência compreende subdomínios característicos desta família de proteínas: um motivo ATP-AMP que é característico dos membros da família de enzimas formadoras de adenilato; e um motivo FATP-ACSVL, que é restrito às FATPs. O motivo ATP-AMP constitui um segmento de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, possui uma região hidrofóbica ligada à membrana responsável pela ligação e transporte dos LCFAs, também é um motivo presente em enzimas Acil-CoA sintase (ACS) (MILGER et al., 2006; BLACK & DIRUSSO, 2003;

DIRUSSO et al., 2008; COE et al., 1999). O motivo FATP-ACSVL está envolvido na atividade intrínseca de Acil-CoA sintase já descrito para algumas FATPs (DOURLIN et al., 2015).

As FATPs facilitam a absorção de ácidos graxos e a maioria delas apresenta atividade Acil-CoA sintase (ACS). As enzimas ACS catalisam a ativação dos ácidos graxos de cadeia longa (LCFA) por adição de uma molécula de coenzima A formando os tio-ésteres Acil-CoA correspondentes.

Figura 7 – (A) Fragmentos das sequências conservadas de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) e proteínas homólogas, demonstrando as regiões consenso; (B) Árvore filogenética de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) de ratos e humanos. Em (A), o alinhamento foi realizado no programa MultAlin tool. Fatp = *Drosophila*; FATP1, 4 e 6 = humanos; ACS-20 e ACS-22 = *Caenorhabditis elegans*; Fat1p = Leveduras. Resíduos em vermelho e azul correspondem a resíduos com forte consenso (>90%) e fraco consenso (>50%). O motivo I e II correspondem, respectivamente, ao motivo ATP/AMP e ao motivo FATP-ACSVL. Em (B), o alinhamento foi realizado no Clustal e árvore filogenética construída no programa TreeViewPPC. *Homo sapiens* = hs; *Mus musculus* = mm.



Fonte: Adaptado de DOURLIN et al., 2015 & STAHL, 2003.

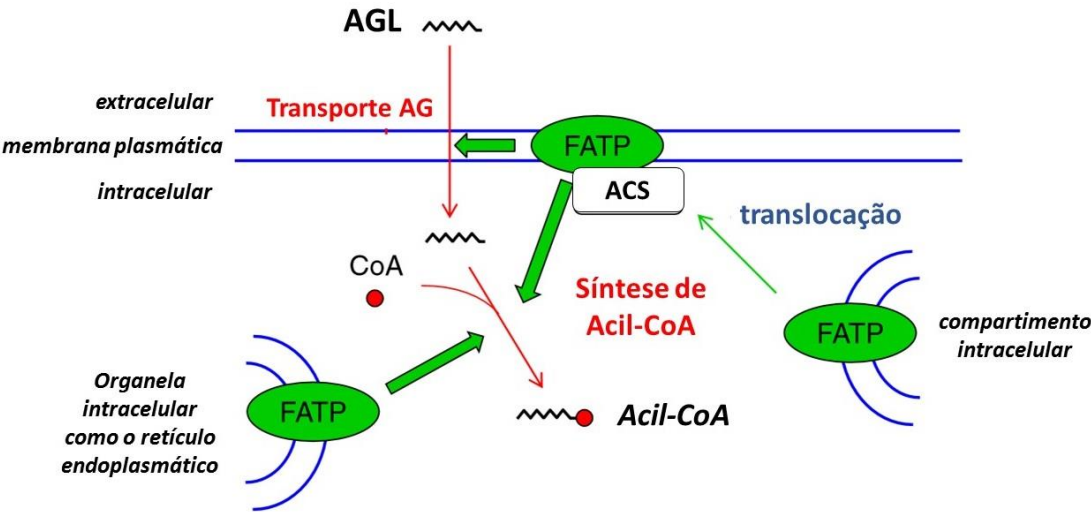
Essa etapa de ativação dos LCFA é necessária para que os ácidos graxos possam ser utilizados como substratos em outras vias metabólicas, como síntese de fosfolipídeos, β -oxidação e síntese de ácidos graxos (BLACK & DIRUSSO, 2007) (Figura 8). Estudos com mutações no gene FATP1 em leveduras e linhagem de células COS1 mostram redução tanto na absorção de ácidos graxos quanto na atividade ACS, o que sugere que as FATPs estão envolvidas nestes dois processos (WATKINS et al., 1998; COE et al., 1999). Estudos também mostram que, em leveduras, as proteínas FATP1 e Acil-CoA sintase de cadeia longa (ACSL-1) formam um complexo, onde a inibição de ACSL-1 impacta na absorção de ácidos graxos, reduzindo a absorção. Ou seja, demonstra que a ativação do LCFA por interação entre FATP1 e ACSL-1 é imprescindível para que os ácidos graxos sejam absorvidos (RICHARDS et al., 2006). Em mamíferos, a atividade ACS das FATPs 1,2,3 e 6 são específicas para ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA), enquanto que a FATP4 exerce atividade ACS também para LCFA (DIRUSSO et al., 2005). Dessa forma, vários estudos recentes sugerem que as FATPs exercem sua função de absorção e ativação de ácidos graxos por um processo chamado de acilação vetorial (DIRUSSO et al., 2008). A acilação vetorial consiste em um processo onde a absorção de ácidos graxos exógenos do plasma está acoplado à ativação desses ácidos graxos por esterificação com coenzima A, reação regulada pelas necessidades metabólicas das células (Figura 8) (BLACK & DIRUSSO, 2003; BLACK & DIRUSSO, 2007). Estudos em levedura *Saccharomyces cerevisiae* evidenciam que as FATPs ativam, preferencialmente, ácidos graxos de cadeia longa e de cadeia muito longa (DIRUSSO et al., 2005).

As FATPs estão localizadas, principalmente, nas membranas celulares, devido ao seu papel na absorção e ativação de ácidos graxos endógenos. Mas algumas isoformas de FATP podem estar dispostas nos espaços intracelulares ou na membrana do retículo endoplasmático, a depender de sua localização tecidual e função. A literatura sugere que a localização celular das FATPs não é estática, elas podem sofrer translocação do citoplasma para a membrana plasmática como resposta à uma sinalização por insulina (STAHL et al., 2002). A FATP1 de adipócitos de *Mus musculus* sofre translocação após sinalização por insulina, localiza-se normalmente no compartimento perinuclear intracelular, co-localizadas com os transportadores de glicose GLUT4, e como são sensíveis à insulina, são translocadas até a membrana plasmática após o estímulo (STAHL et al., 2002). O estímulo à translocação de FATP causado pela insulina evidencia que a regulação hormonal de FATPs desempenham papel importante na homeostase lipídica (STAHL et al., 2002).

A sinalização por insulina estimula a translocação para a membrana plasmática tanto dos transportadores de glicose GLUT4 quanto das FATPs, principalmente no tecido adiposo

branco e músculo esquelético para FATP1, hepatócitos para FATP2 e FATP5, enterócitos para FATP4 e cardiomiócitos para FATP6 (Figura 9) (WU et al., 2006).

Figura 8 – Transporte e atividade Acil-CoA sintase (ACS) de proteínas FATP. AGL = Ácidos graxos livres; AG = Ácidos graxos; CoA = Coenzima A.



Fonte: Adaptado de DOURLIN et al., 2015.

Figura 9 – Expressão de FATPs em tecidos e linhagens celulares após sinalização por insulina (50nM). - : ausência de expressão; + à +++: aumento da intensidade de expressão.

Níveis de expressão no tecido (absorção de LCFA induzida por insulina [% de estimulação])					
FATP	Tecido adiposo branco	Músculo esquelético	Cardiomiócitos	Hepatócitos	Enterócitos
FATP1	+++	+++	+	-	-
FATP2	-	-	-	+++	-
FATP3	+	+	+	++	-
FATP4	++	++	++	+	+++
FATP5	-	-	-	+++	-
FATP6	-	-	+++	-	-

Fonte: Adaptado de WU et al., 2006.

A expressão gênica de FATPs é regulada por nutrientes, hormônios e por algumas citocinas. Dados de estudos recentes mostram que ratos alimentados com dieta rica em lipídeos aumentam a expressão de FATP no coração, mas nenhum efeito é observado na

expressão desta proteína no fígado (OUALI et al., 2000). A regulação da expressão também pode ocorrer pela ação do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), onde são observados efeitos negativos na expressão no fígado e nos adipócitos (MEMOM et al., 1998; STAHL et al., 2002); já os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR- α , PPAR- γ , PPAR- γ /retinoide X) regulam positivamente a expressão de FATPs em ratos e como os derivados de ácidos graxos são ligantes de PPAR, como as prostaglandinas, possivelmente também regulam positivamente a expressão de FATPs (MARTIN et al., 2000). A insulina regula positivamente a translocação de FATPs do citoplasma para a membrana, mas estudos mostram que a sinalização por insulina não afeta a expressão desses genes nos adipócitos (STAHL et al., 2002). O hormônio adiponectina secretado pelos adipócitos também afeta a expressão de FATPs causando aumento da expressão de FATP1 no músculo esquelético (MAEDA et al., 2002). O gene FATP2 em humanos está envolvido no mecanismo fisiopatológico da diabetes gestacional, apresentando expressão diminuída em gestantes obesas (LAPPAS, 2014). Outro hormônio que também regula a expressão gênica de FATPs em humanos é a leptina, um hormônio sintetizado principalmente nos adipócitos que exerce função sobre o controle da ingestão alimentar e é uma adipocina pro-inflamatória. Altos níveis de leptina no tecido adiposo, adipocinas pró-inflamatórias que estão aumentadas no período gestacional, causam diminuição da expressão gênica da FATP2 e FATP6 em tecidos de mulheres obesas com resistência à insulina e em gestantes com diabetes, causando diminuição da absorção de ácidos graxos e reduzindo também a síntese *de novo* de ácidos graxos (LAPPAS, 2014; MEMON et al., 1998; STEINBERG et al., 2002).

São poucas as pesquisas sobre FATPs em insetos, onde a função de FATPs homólogas não está ainda bem caracterizada. Estudos utilizando sequências de proteínas homólogas à FATPs de insetos demonstraram seu envolvimento na síntese de feromônio no bicho da seda *Bombix mori*, pois uma alta expressão de BmFATP foi observada na glândula de feromônio. Técnicas de silenciamento gênico, utilizando RNAi (RNA de interferência), foram utilizadas para caracterizar a função de BmFATP na glândula e os resultados observados mostraram que os insetos com este gene silenciado tinham biossíntese do feromônio bombicol prejudicada, além de ter sua atividade acil-CoA sintase reduzida, o que permite correlacionar com uma possível atividade ACS intrínseca da FATP (OHNISHI et al., 2009). Já em *Eilema japonica*, uma espécie de mariposa, o envolvimento de FATPs homólogas também foi estudado através de expressão funcional em *Escherichia coli* e os resultados demonstraram que não há envolvimento destas proteínas transportadoras na biossíntese de feromônio. Entretanto, níveis transcricionais relevantes de FATP homóloga foram observados na glândula de feromônio,

músculo de vôo, ovário, túbulo de malpighi, corpo gorduroso, intestino médio e epiderme (QIAN et al., 2011). Nenhum dos estudos com proteínas homólogas à FATPs em insetos propõem estudar a função destas proteínas especificamente no metabolismo lipídico. Dessa forma, esta tese tem o intuito de estudar essas lacunas ainda não compreendidas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Caracterizar molecularmente proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) do inseto *Tribolium castaneum* e inferir sobre suas funções biológicas.

3.2 Objetivos específicos:

- Identificar genes codificantes de proteínas homólogas às proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) no genoma de *Tribolium castaneum*;
- Caracterizar a expressão de genes FATP de *T. castaneum* nos tecidos e estágios de desenvolvimento;
- Inibir a expressão gênica de FATP pela técnica de RNAi e verificar os efeitos causados no metabolismo energético;
- Estudar o metabolismo de lipídeos do inseto através da incorporação de inibidor de lipase (Orlistate® - Tetraidroliipstatina) na dieta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Insetos

Os insetos *Tribolium castaneum* utilizados neste trabalho foram obtidos de uma colônia mantida no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da Universidade Federal de Alagoas. Os insetos faziam parte de uma colônia mantida à 30°C com umidade relativa entre 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h. Nos experimentos foram testados todos os estágios de desenvolvimento do inseto.

4.2 Busca de genes FATP no genoma de *Tribolium castaneum*

A busca por sequências de proteínas homólogas a proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) no genoma do *T. castaneum* foi realizada utilizando o banco de dados através do código de acesso do Pfam ([http:// http://pfam.xfam.org/](http://pfam.xfam.org/)) para família de proteínas com domínio de ligação à AMP (Acesso: PF00501). Para buscar sequências pertencentes a essa família dentro do genoma do *T. castaneum* foi utilizada a ferramenta BioMart do portal de genomas Ensembl-Metazoa (<http://metazoa.ensembl.org/biomart>). As sequências encontradas de proteínas com domínio de ligação à AMP foram analisadas no Banco de dados de Domínios Conservados (CDD - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) para identificar quais delas faziam parte da família das FATPs. Para confirmação, as sequências de FATP encontradas foram submetidas ao algoritmo tBLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) dentro do genoma do *T. castaneum* (taxid:7070). As sequências de FATP encontradas no genoma e confirmadas são mencionadas neste texto como TcasFATP e TcasFATPLike.

4.3 Análise Bioinformática

A análise bioinformática foi iniciada com o alinhamento entre as sequências de diferentes FATPs utilizando o programa ClustalW v. 2.0 (LARKIN et al., 2007). A árvore filogenética de relação evolutiva entre as proteínas homólogas foi obtida através do algoritmo estimativa de Máxima Verossimilhança (ECK & DAYHOFF, 1966) utilizando 1000 repetições para os cálculos de “bootstrapping” no programa MEGA 7.0 (TAMURA et al.,

2013). A massa molecular das FATPs e seus pontos isoeletricos teóricos foram obtidos através da análise das sequências no programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005). A predição de peptídeo sinal foi realizada pelo programa SignalP 4.0 (PETERSEN et al., 2011) e a predição da localização celular das FATPs foi realizada utilizando o programa PSORT II (NAKAI & HORTON, 1999). A busca de possíveis sítios de fosforilação nas seqüências proteicas das FATPs foi realizada utilizando o programa NetPhos 3.1 (BLOM et al., 1999). Possíveis regiões de domínio transmembrana foram localizadas com os programas TMHMM 2.0 (KROGH et al., 2001), SOSUI (HIROKAWA et al., 1998), TMpred e HMMTop (TUSNADY & SIMON, 2001). Foi considerada a existência de domínio transmembranar quando o resultado foi positivo em pelo menos 2 programas.

4.4 Caracterização da expressão gênica de TcasFATP e TcasFATPlike em tecidos e estágios de desenvolvimento do inseto por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A expressão de genes FATP foi analisada nos seguintes estágios de desenvolvimento: larva, pupa e inseto adulto. Para análise do perfil de expressão tecidual, as larvas de *T. castaneum* foram dissecadas e o intestino e corpo gorduroso foram retirados para extração do RNA total.

4.4.1 Síntese dos iniciadores

Os iniciadores para amplificação e utilização em RT-qPCR foram desenhados baseados nas sequências de FATP obtidas, utilizando o programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (ROZEN & SKALETSKY, 2000) e posteriormente analisados no Programa OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Os iniciadores utilizados, números de acesso dos genes no NCBI e tamanho dos amplicons estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Genes, número de acesso no NCBI, sequência dos iniciadores desenhados e tamanho dos fragmentos amplificados pelos primers utilizados.

Gene	Símbolo	Número de acesso (NCBI) / Referência	Sequência dos iniciadores	Tamanho do amplicon (pb)
Proteína Transportadora de Ácidos Graxos de cadeia longa 4	TcasFATP	XP_008193688.1	F-CAAATGCACG ATTGCTCAGT R-ACAATGTTG GCGTTTCCTTC	~200
Proteína Transportadora de Ácidos Graxos de cadeia longa 4 Like	TcasFATPLike	XP_967675.1	F-CGGCCCTGA TCAACAGTAAT R-CAATGGTCC GTCTTGTCCT	~200
Proteína Ribossomal S3	TcasRPS3	NP_001165863.1	F-CCGTCTGATTC GTGAATTGACTT R-TCTAAGAGACTC TGCTTGTCGAATG	~200
Sulfakinina	TcasSK	EFA04708.1	F-GGCAGCGATTA AGCCAATAA R-TGCAAAATTTA TTACCAGCCATT	~200
Receptor de insulina	TcasInR	LIN et al., 2016	F-ACCCAAAGTGGT GAATAGCA R- TCGTCCATCATAG AGCGTAA	~200
Peptídeo semelhante à Insulina 1	TcasIn1	SHENG et al., 2011	F- TTACGTCTGGTC TTCACCGCACAT R-TGGTTGGGTTTG GATTCCGGAGAGT	~200
Peptídeo semelhante à Insulina	TcasIn2	SHENG et al., 2011	F- TGGCCGGAATA CACACTTGTAGGA R- TCTTCTCCGCAG TAGACCGCTTT	~200

Fonte: Autor, 2018.

Como gene de referência, foi utilizado o gene codificante para Proteína Ribossomal 3 de *T. castaneum* (TcasRPS3). Este gene foi escolhido devido ao seu intenso uso em estudos de expressão gênica e por apresentar um perfil de expressão estável já comprovado em *T. castaneum*, principalmente em estudos entre estágios de desenvolvimento do inseto (TOUTGES et al., 2010).

4.4.2 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído com o kit *Maxwell®16 LEV simplyRNA tissue* utilizando o equipamento extrator de ácidos nucleicos *Maxwell®16 Forensic Instrument* (Promega, Madison, EUA), conforme as recomendações do fabricante. Primeiramente, os insetos ou tecidos previamente dissecados em estereoscópio foram macerados em 200µL de solução de homogeneização, onde foram adicionados mais 200µL do tampão de lise para agitação em vórtex. As amostras processadas foram colocadas no primeiro poço do cartucho de extração e 5µL da enzima DNase foi adicionado ao poço 4 do cartucho. O cartucho de extração foi montado no equipamento com os *plugs* e os tubos de eluição e submetidos à extração por aproximadamente 60 minutos. O método de extração é baseado no uso de partículas magnéticas para extração do RNA e o próprio protocolo do equipamento já inclui o tratamento com DNase para retirada da contaminação por DNA genômico.

4.4.3 Dosagem de RNA total

Após a extração e o tratamento com DNase, as amostras de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro L-quant (Loccus, Cotia, BRA). As dosagens foram realizadas no Laboratório de Biologia Integrativa da Universidade Federal de Alagoas, coordenado pela Profa. Tamí Mott. As amostras de RNA também foram avaliadas quanto à pureza por análise da razão entre a absorbância observada no comprimento de onda de 260nm e 280nm. As amostras foram consideradas próprias para uso quando a razão 260/280 foi maior que 1.8 e menor que 2 (LEHNINGER et al., 2004). A partir da definição da concentração de cada extrato de RNA total, as amostras foram diluídas e utilizados 20ng de RNA em cada reação de PCR. Todos os experimentos foram padronizados utilizando 20ng de RNA em cada reação.

4.4.4 Determinação da eficiência dos iniciadores

Para determinar a concentração ideal para melhor eficiência na amplificação, várias concentrações dos iniciadores, dentro da faixa recomendada pelo fabricante, foram testadas. As reações de amplificação foram otimizadas utilizando 0,2 μ M de cada um dos iniciadores (senso e anti-senso) e 33nM de *CXR Reference Dye*.

4.4.5 Determinação da eficiência de amplificação e análise da curva de dissociação

Para determinação da eficiência de amplificação, foram geradas as curvas-padrão baseadas em cinco pontos de diluições 1:2 (20ng, 10ng, 5ng, 2.5ng, 1.25ng) do RNA. Para isso, utilizou-se o valor de CT obtido em cada diluição versus o log das respectivas diluições. A partir da correlação entre esses dois fatores, as eficiências de amplificação (E) foram determinadas através da fórmula:

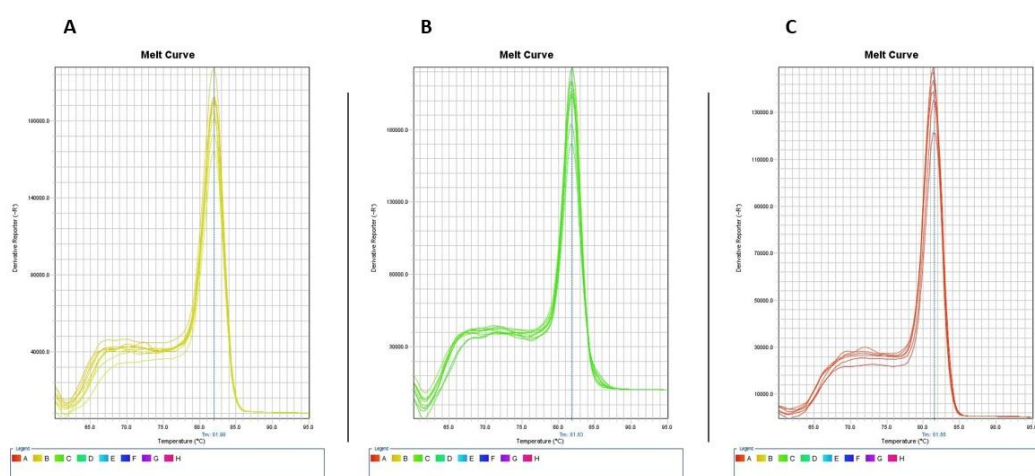
$$E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100,$$

em que slope é a inclinação da reta obtida.

A determinação da eficiência de amplificação em experimentos de RT-qPCR é de fundamental importância, pois os cálculos realizados para obtenção dos níveis de expressão relativa através do método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001) levam em consideração que as reações de amplificação estão ocorrendo com eficiência de amplificação dentro do intervalo de 90-110%. A eficiência de amplificação geralmente é calculada através da variação da concentração de cDNA utilizada na amplificação. Porém, como o reagente utilizado neste trabalho faz transcrição reversa e amplificação em uma só etapa, pois usa como molde o RNA, consideramos a margem de eficiência dentro do intervalo 90-120%.

Para avaliar a especificidade de amplificação das reações de amplificação e a possível formação de dímeros, foi realizada a curva de dissociação (curva de *Melt*). Os resultados das curvas de dissociação mostram a presença de apenas um pico (Figura 10), o que garante a ausência de amplificações inespecíficas ou de formação de dímeros de primers.

Figura 10 - Curvas de dissociação obtidas dos primers dos genes analisados, geradas pelo programa StepOnePlus™ (Applied Biosystems). (A) TcasFATP; (B) TcasFATPLike; (C) TcasRPS3.



Fonte: Autor, 2018.

4.4.6 PCR em tempo real (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o Kit *GoTaq® 1-Step RT-qPCR System* (Promega, Madison, EUA), segundo instruções do fabricante. Todos os experimentos foram realizados no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time qPCR System* (Applied Biosystems, Foster city, EUA) do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Alagoas, sob coordenação do Prof. Daniel Leite Góes Gitaí. Em cada reação de qPCR foram adicionados 10µL de *GoTaq® qPCR Master Mix 2x*, 0.2µM de cada um dos iniciadores (senso e anti-senso), 0.4µL de *GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR 50x*, 20ng de RNA, 33nM de *CXR Reference Dye* e água livre de nuclease para completar o volume total de 20µL da reação. O programa termociclador utilizado para a reação de *RT-qPCR 1-Step* seguiu as seguintes condições: 15 minutos à 37°C para transcrição reversa; 10 minutos à 95°C para inativação da Transcriptase Reversa; 40 ciclos de 10 segundos à 95°C

(desnaturação), 30 segundos à 60°C (anelamento) e 30 segundos à 72°C (alongamento). E por fim, a dissociação através da curva de *Melting* (60-95°C). Os fragmentos produzidos nas reações de RT-qPCR tem aproximadamente 200pb. Todos os pontos experimentais foram feitos em triplicata e os brancos foram feitos utilizando água livre de nuclease ao invés de RNA. O número de ciclos de PCR em que a fluorescência atingiu o limiar (*threshold*) na curva de amplificação –*threshold cycle* (Ct) – foi determinado automaticamente pelo programa *StepOnePlus*TM (Applied Biosystems).

Todas as reações de qPCR foram realizadas conforme o protocolo descrito neste tópico, sendo apenas as amostras diferentes, de acordo com a proposta do experimento (estágios diferentes de desenvolvimento do inseto, tecidos dissecados, insetos tratados com fármacos).

4.4.7 Análise dos dados do RT-qPCR

Os valores de $\Delta\Delta Ct$ e de quantidade relativa expressão foram calculados a partir dos valores de Ct (“*threshold cycle*”, que é o número de ciclos necessários para produzir uma quantidade de fluorescência definida), obtidos através do PCR em tempo real, segundo (NORGARD et al., 2006). Esses valores foram utilizados para as análises estatísticas específicas de cada experimento (teste t de Student, ou ANOVA de uma ou duas vias) conforme indicado nas legendas das figuras. Os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram utilizados apenas para montagem dos gráficos.

4.5 Avaliação dos efeitos da injeção de dsRNA para TcasFATP em larvas de *T. castaneum*

Os experimentos utilizando a técnica de RNA interferente (RNAi) foram realizados em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob orientação da Profa. Dra. Kátia Calp Gondim e Prof. David Majerowicz.

4.5.1 Síntese de dsRNA para TcasFATP

Para a realização da técnica de RNAi, foi produzido um dsRNA que cobria toda a sequência de leitura aberta (ORF) do gene TcasFATP. Como controle não-relacionado, foi produzido um dsRNA homólogo a uma proteína ligadora de maltose de *Escherichia coli* (Mal).

Para a produção de molde para a síntese do dsRNA para a proteína Mal, as reações de PCR utilizaram a enzima Taq DNA Polimerase (Fermentas). As misturas de reação para PCR continham 5 µl de tampão para Taq DNA Polimerase, 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 2 µl do iniciador T7minimal (5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - 3') (15 µM), 0,2 µl da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 0,2 µl do plasmídeo 28iMal (0,5 µg/µl) (New England BioLabs, Ipswich, EUA) e H₂O Milli-Q autoclavada para completar um volume final de 50 µl. As amostras foram levadas ao termociclador sob o programa: 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 44 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min; e 72 °C por 10 min. Essa reação de PCR gerava um fragmento de aproximadamente 1000 pb. Para a produção do molde para a síntese do dsRNA para o gene TcasFATP, as reações de PCR utilizaram a enzima Taq DNA Polimerase (Fermentas). As misturas de reação para PCR continham 5 µl de tampão para Taq DNA Polimerase, 3 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTP (10 mM), 0,4 µl do iniciador senso (15 µM), 0,4 µl do iniciador anti-senso, 0,2 µl da enzima Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1 µl de cDNA produzido a partir de RNA de larvas de 20 dias de *T. castaneum* como descrito nas seções anteriores e H₂O Milli-Q autoclavada para completar um volume final de 50 µl. As amostras foram levadas ao termociclador sob o programa: 94 °C por 2 min; 5 ciclos de 94 °C por 30 seg, 45 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg; 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 62 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg; e 72 °C por 10 min. Os iniciadores utilizados foram:

TcasFATPRNAiF: 5' - T7-AATTTTAGTTGCTATCGTTG (senso)

TcasFATPRNAiR: 5' - T7-TTTGGTTGGTGTATTAGT (anti-senso)

Essa reação de PCR gerava um fragmento de aproximadamente 400 pb. A qualidade de ambos os produtos de PCR foi checada por eletroforese em gel de agarose 1,5 % com 0,2 µg/ml de brometo de etídio. Terminada a eletroforese, as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador UV e o gel foi fotografado. Esses produtos de PCR só foram

utilizados como molde para a síntese de dsRNA caso não fossem detectadas bandas não-específicas ou dímeros de iniciadores. O dsRNA para o gene foi produzido com o kit MEGAScript® RNAi Kit (Ambion, Austin, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, como descrito abaixo.

Primeiramente, o dsRNA foi produzido por uma reação de transcrição utilizando uma T7 RNA Polimerase. Em um tubo de 0,2 ml no gelo, foram adicionados de 1 a 2 µg de produto de PCR como molde de gene a ser silenciado, 2 µl de tampão para T7 RNA Polimerase (10x), 2 µl de ATP (75 mM), 2 µl de UTP (75 mM), 2 µl de CTP (75 mM), 2 µl de GTP (75 mM), 2 µl da enzima T7 RNA Polimerase e H₂O-DEPC 0,1% (Merck) suficiente para completar um volume final de 20 µl. A reação foi incubada por 16 horas a 37°C. Após essa incubação, a reação foi aquecida a 75 °C por 5 min e resfriada a temperatura ambiente, para maximizar a formação de dupla-fita. Após essa etapa, foram adicionados ao tubo 5 µl de tampão de nucleases (10x), 2µl de DNase I (2 U/µl), 2 µl de RNase e H₂O-DEPC 0,1% (Merck) suficiente para completar um volume final de 50 µl. A reação foi então incubada a 37 °C por 1 hora. Após a digestão com as nucleases, a reação foi transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e a ela foram adicionados 50 µl do tampão de ligação (10x), 250 µl de etanol 100% (Merck) e H₂O-DEPC 0,1% (Merck) para completar um volume final de 500 µl. A amostra foi transferida para a coluna de purificação do kit e centrifugada a 14000 g por 2 min a temperatura ambiente. A coluna foi então lavada duas vezes com tampão de lavagem através de centrifugação a 14000 g por 2 min a temperatura ambiente. O dsRNA foi eluído da resina da coluna com 100 µl de H₂O-DEPC 0,1% (Merck) aquecida a 95 °C e centrifugação a 14000 g por 2 min a temperatura ambiente. O procedimento foi repetido duas vezes, totalizando uma eluição com 200 µl de volume final.

Após cada etapa de síntese, ou seja, transcrição, anelamento, tratamento com nucleases e purificação, uma alíquota equivalente a 1/200 do volume total foi retirada para avaliação da eficiência de síntese do dsRNA. As alíquotas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% com 0,2 µg/ml de brometo de etídio. Terminada a eletroforese, as bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta em transiluminador UV e o gel foi fotografado. As amostras de dsRNA foram dosadas por espectrometria em cubetas de quartzo (LEE & SCHMITTGEN, 2006). As amostras foram diluídas 250 vezes em água deionizada e a concentração de RNA nas amostras foi medida considerando que cada unidade de D.O. a 260nm equivale à concentração de 45 µg/ml de dsRNA.

As amostras de dsRNA foram então evaporadas totalmente em liofilizador a vácuo, ressuspendidas em tampão de eluição (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) até a concentração de 1 µg/µl e conservadas a -20 °C até o uso.

4.5.2 Injeção de dsRNA para TcasFATP em larvas de *T. castaneum*

A injeção do dsRNA foi realizada utilizando o microinjetor Nanoject II (Drummond Scientific Company, Pensilvânia, EUA), foram aplicados 96 nanolitros de dsRNA no 3º segmento dorsal das larvas com 15 dias de idade (L15). As larvas injetadas foram acompanhadas a fim de observar alterações fenotípicas. Os níveis de Triacilglicerol, Beta-Oxidação e a expressão do gene TcasFATP foram quantificados 3 dias após a injeção, conforme descrito por Alves-Bezerra et al. (2016). A quantificação de Triacilglicerol (TAG) foi realizada conforme descrito no item 4.5. As larvas que foram injetadas com dsRNA, após 3 dias tiveram seu RNA total extraído conforme descrito no item 4.4.2 e a expressão do gene TcasFATP foi posteriormente quantificada conforme descrito no item 4.4.6.

4.5.3 Medida de β-Oxidação

Corpos gordurosos de larvas de *T. castaneum* foram dissecados e homogeneizados em tampão H gelado (HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, sacarose 0,25 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, coquetel de inibidores de proteases 0,002% (Sigma), utilizando homogeneizador tipo PotterElvehjem (15 movimentos), no 3º dia (insetos silenciados para TcasFATP) após a injeção. As amostras (150 µg de proteína) foram diluídas em meio de reação contendo Tris-HCl 75 mM, pH 7,4, MgCl₂ 2 mM, albumina (livre de ácidos graxos) 2 mg/mL, ATP 5 mM, DTT 5 mM, CoA 0,2 mM, L-carnitina 10 mM, palmitato 20 mM e 8 µCi [3H]palmitato (0,1 µCi/µL; Perkin-Elmer) em volume final de 200 µL. Após incubação a 28°C por 30 min, a reação foi interrompida por adição de 200 µL de ácido perclórico 24% gelado, e armazenada a 4°C por ao menos 16h para precipitação da albumina conjugada ao palmitato não oxidado.

As amostras (aproximadamente 100 µL) foram então transferidas para microtubos, e centrifugadas a 14.000 rpm e 4°C por 5 min. O sobrenadante foi transferido para tubos cônicos de vidro e as fases aquosa e orgânica foram separadas pela adição de 400 µl de H₂O, 1 mL de metanol, e 2 mL de clorofórmio, seguido de forte agitação por 2 minutos e centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos (BLIGH e DYER, 1959). A radioatividade

associada à fração aquosa foi determinada por contagem em cintilador líquido na presença de 2 mL de Optiphase Hisafe 3 (Perkin-Elmer).

4.5.4 Quantificação de Triacilglicerol

No 3º dia após a injeção de dsRNA, as larvas foram maceradas em salina 0,9% e os extratos centrifugados para obtenção do sobrenadante para as análises. Os extratos proteicos foram padronizados por quantificação de proteínas (Bradford, 1976) e submetidos a quantificação de Triacilglicerol conforme descrito no item 4.7.

4.6 Avaliação dos efeitos do Orlistate® (tetraidrolipstatina) nos índices nutricionais, triacilglicerol e na expressão de genes relacionados

O fármaco Orlistate® (tetraidrolipstatina) foi incorporado em discos de farinha de trigo, conforme descrito por Xie et al. (1996). Grupos de 30 larvas com 10 dias de idade (L10) foram colocados em placas de Petri com disco de farinha incorporado com fármaco (concentração final 0,1mg Orlistate/mg de farinha). O peso das larvas, dos discos e a mortalidade foram acompanhados nos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h, 96h (XIE et al., 1996). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e o controle foi feito utilizando discos somente com farinha de trigo. Os índices nutricionais foram calculados a partir das fórmulas de Taxa de crescimento relativo (RGR), Taxa de consumo relativo (RCR) e Eficiência de conversão de alimento ingerido (ECI) (XIE et al., 1996).

RGR = mg de biomassa ganha/mg de biomassa inicial do inseto x dia

RCR = mg de biomassa ingerido/mg de biomassa inicial do inseto x dia

ECI (%) = biomassa ganha/alimento ingerido x 100

Os dados de mortalidade observados nos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h e 96h após início do tratamento foram utilizados para traçar a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier.

As larvas, tanto do grupo controle quanto do tratamento, após o acompanhamento por 96h foram utilizadas para extração de RNA total e as amostras foram submetidas ao RT-

qPCR para determinar a expressão das proteínas transportadoras de ácidos graxos (TcasFATP e TcasFATPLike) e de genes envolvidos na sinalização (TcasIn1, TcasIn2, TcasSK, TcasInR). O perfil de expressão dos genes foi comparado entre as larvas do grupo controle e as larvas tratadas com Orlistate por 96h.

Além disso, as larvas do grupo controle e do grupo tratado com Orlistate também foram utilizadas para quantificar os triacilglicerol (TAG) no corpo total, conforme descrito no item 4.7.

4.7 Quantificação de Triacilglicerol (TAG)

Para quantificação dos triacilgliceróis das larvas submetidas aos tratamentos, 20 larvas foram maceradas em 600µL de salina 0,9% e o homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante e o *fat cake* formado foram retirados, homogeneizados e utilizados como amostra para as dosagens de TAG. Essas amostras foram então quantificadas quanto à concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976), a fim de padronizar as análises da concentração de TAG por quantidade de proteína. Dessa forma, o volume correspondente a 20µg de proteína de cada extrato foi utilizado para dosar Triacilglicerol. As dosagens de Triacilglicerol foram realizadas com kit comercial (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, BR), segundo orientações do fabricante. As amostras foram incubadas com o reagente analítico à 37°C por 10 minutos em placas de 96 poços, depois da incubação procedeu-se a leitura em leitora de microplacas *Flex Station 3* (Molecular Devices, California, EUA) no comprimento de onda 505nm. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos à concentração através de uma curva padrão para triacilglicerol. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata e o branco foi feito com reagente na ausência de amostra. Os valores de concentração de TAG foram expressos no gráfico como mg de TAG/mg de proteína.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Busca de sequências homólogas à FATP e Análise Bioinformática

A busca por sequências de proteínas homólogas a proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATPs) no genoma do *Tribolium castaneum* foi iniciada no banco de dados através do código de acesso do Pfam para família de proteínas com domínio de ligação à AMP (Acesso: PF00501). Na busca das sequências pertencentes a essa família dentro do genoma do *T. castaneum* (Ferramenta BioMart - Ensembl-Metazoa) foram encontradas 32 sequências de proteínas com domínio de ligação à AMP e a análise dessas sequências no Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) revelou que apenas 2 dessas sequências fazem parte da família das FATPs. Essas 2 sequências encontradas foram submetidas ao algoritmo tBLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) dentro do genoma do *T. castaneum* (taxid:7070), confirmando a presença de 2 sequências de FATP depositadas no banco de dados, anotadas como FATP4 (nº de acesso NCBI: XP_008193688.1) e FATP4like (nº de acesso NCBI: XP_967675.1). As 2 sequências de FATP homólogas foram alinhadas no programa ClustalW v. 2.0 (LARKIN et al., 2007) para confirmação de que não se tratavam da mesma proteína (Figura 11). A existência de apenas 2 sequências para FATP foram também confirmadas por parceria com o Laboratório de Bioinformática do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (sob orientação do Prof. Dr. Rafael Dias Mesquita). A análise bioinformática e todos os estudos de expressão foram conduzidos baseados nestas duas sequências, aqui identificadas como TcasFATP e TcasFATPlike, respectivamente.

O alinhamento das seqüências de aminoácidos de TcasFATP e TcasFATPlike com FATPs de variados organismos, realizado com o programa ClustalW v. 2.0 (LARKIN et al., 2007), mostrou que as sequências possuem regiões bastante conservadas, incluindo 2 domínios característicos de FATPs já bem descritos na literatura: domínio ATP/AMP e domínio de ligação de ácidos graxos FATP/ACSVL (Figura 12) (OHNISHI et al., 2009; DIRUSSO et al., 2008). Sendo o domínio de ligação ATP/AMP responsável pela ligação de ATP, domínio comum em enzimas formadoras de adenilato (MILGER et al., 2006; BLACK & DIRUSSO, 2003; DIRUSSO et al., 2008), e o domínio FATP/ACSVL (restrito às FATPs) que contribui para a especificidade de ligação de ácidos graxos e está envolvido na atividade intrínseca de Acil-CoA sintase já descrito para algumas FATPs (BLACK & DIRUSSO, 2003;

DOURLEN et al., 2015). Na Figura 12 foram alocados apenas os fragmentos que continham domínios conservados de FATP.

Figura 11 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos de TcasFATPLike e TcasFATP. (*), (:) e (.) indicam identidade, alta similaridade e baixa similaridade, respectivamente.

```

TcasFATPlike -----
TcasFATP      MDKKINGNAKICENRQSEDLESGKAAVGEESSRESATRHKSLKTRPVRVLIRRLVMTAI

TcasFATPlike -----MIFT--AVFVILLSIFLLTNRRYRWFYIIYKTLGRDVRAGIRFTIL
TcasFATP      VAVLVALSAVVCFFLGWKCLVQLILVAIVAYLAAGKWRWFYVALMTAPRDIKALYKYLRRL
                  : . . . : : : : * : : : : : * * : : * : : *

TcasFATPlike NFQLWRYEKTNQTVAKIFTKLVAKHPQKVAFYFESEIWTFFEDVDKYSNKIAHYFKNEGFK
TcasFATP      LIQIKSWQREDVTLADIFRRNVKRHPNKACILFEDQEWSSFAQL EEYSNKVANVFKSHGYK
                  : * : : : : * . * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

TcasFATPlike RGDVALVLESRPEYVTLWLGLAKIGVVTALINSLVADPLAHSIQVADAKAVVYGSDF
TcasFATP      KGDVVALFLENRPEFIALWLGLSKLGVITPLINTNQRLDSLVSITIAGSQAVIFGSDLS
                  : * * * * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

TcasFATPlike KGINDISGKIP-KVKLYQFGKSDQLLPN-SVDLIKELEKEQDGLTSDIKSGKPRDKLLF
TcasFATP      DAIDVFEKIEAKVTFYQLCITDKSNVDQRFRLRLINDAPPTPPSISEKLHHHDLRVY
                  : . * * : * * * * : * : : : : * : : * : : * : :

TcasFATPlike IFTSGTTGLPKAAVITNLRFFFMALGIRYMAVITEDDIYDPLPLYHSAGAIVGVGQCIL
TcasFATP      IYTS GTTGLPKAAVISSRYIFIAAAIHWLSGFKSSDCFYTPLPLYHTAGGCMSVGQMLI
                  * . * * * * * * : : * : * : : : : * : * * * * * * : : * * : :

TcasFATPlike KGTTVIRKKFSASYFWDCIKYRCTVAQYIGEICRYLLAAHASDDRSIPHQVTKMLGNG
TcasFATP      YGATLVIRKKFSASAYFPDCEKYKCTIAQYIGEMCRYILAVPPKP-SDTQHHLRMIYGN
                  * . * . * * * * * : : * * * . * . * * * * * * . * . * : : * *

TcasFATPlike LRPQIWNKFVTRFGVKEVEFYGATEGNSNLINIDSKVGAVGFVPRYASIFYPVTLIKCD
TcasFATP      LRPQIWCEFVERFKIPKVAEFGATEGNANIVNDNTVGAIGFVSRIIPSVYPSIISKVD
                  * * * * * : * * * : . * * * * * * : * . * . * * * * * * * : * : : * *

TcasFATPlike EETGAPIRNSDGFQRCDPGEPGVCIGIVNPKKTVNDFAGYADKKATEKKLIENVFKKGD
TcasFATP      PQTGEPIRNAHGLCVCKPNEPGVFIGKIIPNNPSRAFLGYVDEEASKKKVVDVFRGD
                  : * * * * * : * . * * * * * * : : : . * * * : : : : : : : * : : *

TcasFATPlike RYFNSGDILIQDEFGYYFFKDRTGDTFRWKGENVATSEIEAVISNIVLSDAIVYGVEIP
TcasFATP      KAFLSGDILVADEFGYLFKDRTGDTFRWKGENVSTSEVEAVLSNVISYKDVVYGVVEIR
                  : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * : * : * * * *

TcasFATPlike GTEGRAGMVAIVDRNNTLNMKQFCLGLKNNLPSYAVPIFVRVMTTPMTGTYKLLKKTQL
TcasFATP      GVEGRAGMAAIFDPEGTVDLAQLAEGTKKALPFYARPIFIRILKKLDMTGTYKLLKKNLQ
                  * . * * * * * * * : : * : : * . * * : * * * * * * : : : * * * * * * : *

TcasFATPlike KEGFNLEKIQDKLFLYDAKNVDYIELTKEYHDMTGKQVRL
TcasFATP      KEGFDVSKISDDIYYLDSKG-TYSLVTPEVYQQINDGIIRV
                  * * * : : * * . : : * . * * : * * * * * * * : * :

```

Fonte: Autor, 2018.

Figura 12 - Fragmentos do alinhamento de seqüências de FATP de diferentes espécies utilizando o ClustalW v.2.0. São mostrados apenas os fragmentos onde há domínios conservados característicos das FATPs. O domínio ATP/AMP está destacado em vermelho e o domínio FATP-ACSVL está destacado em preto. As seqüências de FATP de *T. castaneum* estão destacados em amarelo. ScerFATP1 = *Saccharomyces cerevisiae*; MmusFATP4 = *Mus musculus*; TcasFATPLIKE = *Tribolium castaneum*; BmoriFATP = *Bombix mori*; TcasFATP = *Tribolium castaneum*; DmFATP = *Drosophila melanogaster*; AgFATP = *Anopheles gambiae*.



Fonte: Autor, 2018.

As relações de ancestralidade entre as seqüências de aminoácidos das FATPs estão dispostas na árvore filogenética, que foi construída com as 2 seqüências de *T. castaneum* e com seqüências de FATP de outras espécies retiradas do GenBank utilizando o software MEGA 6.0 com o algoritmo Maximum likelihood e bootstrap de 1000 replicações (Figura 13). As seqüências de FATP de *T. castaneum* apresentam-se em clados diferentes na árvore filogenética, indicando que pertencem a grupos diferentes de FATPs, o que sugere que

possam ter ganho funções especializadas durante a evolução. Este resultado também é evidenciado pela predição da localização celular que indica localizações subcelulares diferentes. A TcasFATPLike foi agrupada, na filogenia, próxima ao clado de Acil-CoAs sintases de cadeia muito longa do hemíptero *R. prolixus* (RproIACSVL 1 e 2), o que sugere que esta proteína também apresenta atividade Acil-CoA sintase intrínseca, por possuir regiões homólogas da sequência de aminoácidos que compreendem o domínio FATP/ACSVL envolvido na ativação de ácidos graxos (DOURLIN et al., 2015, ALVES-BEZERRA et al., 2016).

Figura 13 – Árvore filogenética construída utilizando o software MEGA 6.0 com o algoritmo Maximum likelihood e bootstrap de 1000 replicações. EjFATP = *Eilema japonica*; AsFATP = *Ascotis selenaria*; BmoriFATP = *Bombix mori*; OsFATP = *Ostrinia scapularis*; TcasFATP = *Tribolium castaneum*; TcasFATPlike = *Tribolium castaneum*; DmFATP = *Drosophila melanogaster*; CqFATP = *Culex quinquefasciatus*; AgFATP = *Anopheles gambiae*; TcasFATPLIKE = *Tribolium castaneum*; MsFATP = *Manduca sexta*; MmusFATP = *Mus musculus*; HsFATP = *Homo sapiens*; RproIACSVL = *Rhodnius prolixus*, AcilCoA Sintase de cadeia muito longa/proteína transportadora de ácido graxo; ScerFATP1 = *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Autor, 2018.

A análise bioinformática para a sequência TcasFATP de *Tribolium castaneum* sugeriu que esta proteína possui domínio transmembranar (a predição foi realizada em 4 programas: TMHMM 2.0, SOSUI, TMpred e HMMTop e considerou-se presente o domínio quando o resultado foi positivo em pelo menos 2 dos programas). A presença de domínio transmembranar já é bem caracterizada na literatura de FATPs de insetos e mamíferos (OHNISHI et al., 2009; LEWIS et al., 2001). A localização subcelular foi predita utilizando o Programa PSORT II e os resultados sugeriram sua localização na membrana celular, correlacionando com os resultados encontrados para a presença de domínios transmembranares da família de FATPs (HALL et al., 2003; OHNISHI et al., 2009). Não foi predito a presença de peptídeo sinal na sequência de TcasFATP (Tabela 2), em contraposição aos resultados positivos para domínio transmembrana. Estes resultados podem sugerir que esta não é uma proteína transmembrana propriamente dita, podendo estar somente associada à membrana, sofrendo translocação para domínio transmembranar após sinalização por insulina ou outro sinalizador (MAJEROWICZ, 2009; STAHL et al., 2002). Os resultados da análise no programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) estimam para TcasFATP uma proteína de 699 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 78kDa e ponto isoelétrico de 8,96 (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise Bioinformática das sequências de proteínas homólogas a FATP de *Tribolium castaneum*. As predições foram feitas nos Programas SignalP 4.0 (Peptídeo sinal); TMHMM 2.0, SOSUI, TMpred e HMMTop (Domínio Transmembrana); ProtParam (Peso molecular, Ponto isoelétrico, localização subcelular e nº de aminoácidos); NetPhos 3.1 (sítios de fosforilação).

	<i>TcasFATP</i>	<i>TcasFATPLike</i>
Peptídeo Sinal	Não	Não
Domínio Transmembrana	Sim	Sim
Peso Molecular	78,4 kDa	70,4kDa
pI	8,96	9,03
Localização subcelular	Membrana Plasmática	Retículo endoplasmático
Nº de aminoácidos	699 aa	623 aa
Sítios de fosforilação	~ 55	~ 49

Fonte: Autor, 2018.

Os resultados da análise bioinformática para a sequência de TcasFATPLike também demonstram a presença de domínios transmembranares e a ausência de peptídeo sinal (Tabela 2). A localização celular predita mostrou alta porcentagem para o retículo endoplasmático, resultado possivelmente relacionado à origem desta organela na invaginação da membrana

plasmática. Gene homólogo à FATP em *Caenorhabditis elegans* (ACS-20) foi localizado no retículo endoplasmático, mas nenhuma expressão deste gene foi observada na membrana plasmática do nematódeo, sugerindo que não há envolvimento desta proteína no transporte direto de ácidos graxos, sendo o transporte dependente da sua translocação para a membrana (KAGE-NAKADAI et al., 2010). Já os resultados da análise no programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) estimam que TcasFATPlike é uma proteína de 623 aminoácidos, com peso molecular de aproximadamente 70kDa e ponto isoelétrico de 9,03.

A predição dos sítios de fosforilação das sequências de FATP foi realizada utilizando o NetPhos 3.1, os resultados demonstram as posições dos resíduos de Serina, Treonina e Tirosina nas sequências de FATP que foram identificados como possíveis sítios de fosforilação (Tabela 2). Para TcasFATP foram preditos aproximadamente 55 sítios passíveis de fosforilação, enquanto em TcasFATPlike 49 sítios de fosforilação foram identificados. Porém, como o programa utilizado não leva em consideração a estrutura tridimensional da proteína, possivelmente muitos dos sítios identificados estão localizados em regiões não acessíveis pelas cinases. Não há relatos na literatura de fosforilação em FATPs como mecanismo de ativação da atividade dessas proteínas.

5.2 Caracterização da expressão gênica de TcasFATP e TcasFATPlike em tecidos e estágios de desenvolvimento por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

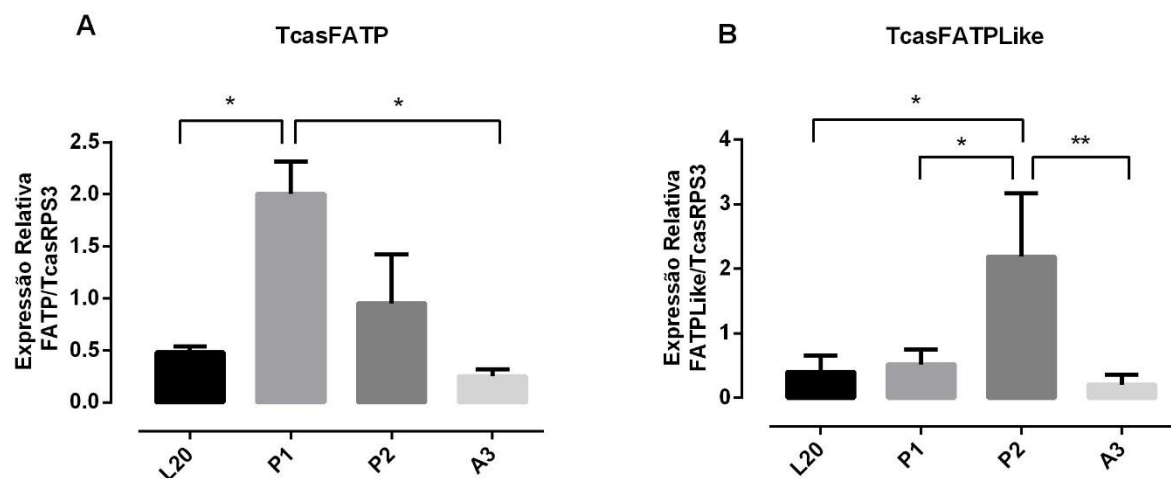
A expressão dos genes TcasFATP e TcasFATPlike no inseto *T. castaneum* foi caracterizada entre os estágios de desenvolvimento e nos tecidos. Os valores de $\Delta\Delta Ct$ e de quantidade relativa de expressão foram calculados a partir dos valores de Ct (*threshold cycle*) obtidos através do PCR em tempo real (NORGARD et al., 2006). Os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram utilizados para montagem dos gráficos. A proteína ribossomal 3 foi utilizada como controle endógeno.

A expressão relativa dos genes codificantes para FATP foi avaliada ao longo dos estágios de desenvolvimento do inseto: Larvas de 20 dias (L20), Recém pupas (P1), Pupas (P2) e Adultos de 3 dias (A3) (Figura 14).

Os resultados mostram expressão das FATPs em todos os estágios de desenvolvimento do inseto, para ambos os genes. Porém, para TcasFATP há maior expressão nos estágios de

pupa (P1 e P2) (Figura 14A), possivelmente relacionado ao seu envolvimento com alta demanda energética característica dessa fase, devido às transformações que ocorrem para o processo de muda para a fase adulta (ZIEGLER, 1991).

Figura 14 – Expressão relativa de TcasFATP (A) e TcasFATPLike (B) durante os estágios de desenvolvimento de *T. castaneum* por PCR em tempo real. L20 = Larva de 20 dias; P1 = recém pupas; P2 = Pupas; A3 = Adultos de 3 dias. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. *: Significativamente diferentes por teste de ANOVA uma via, $p < 0,01$; **: $p < 0,005$.

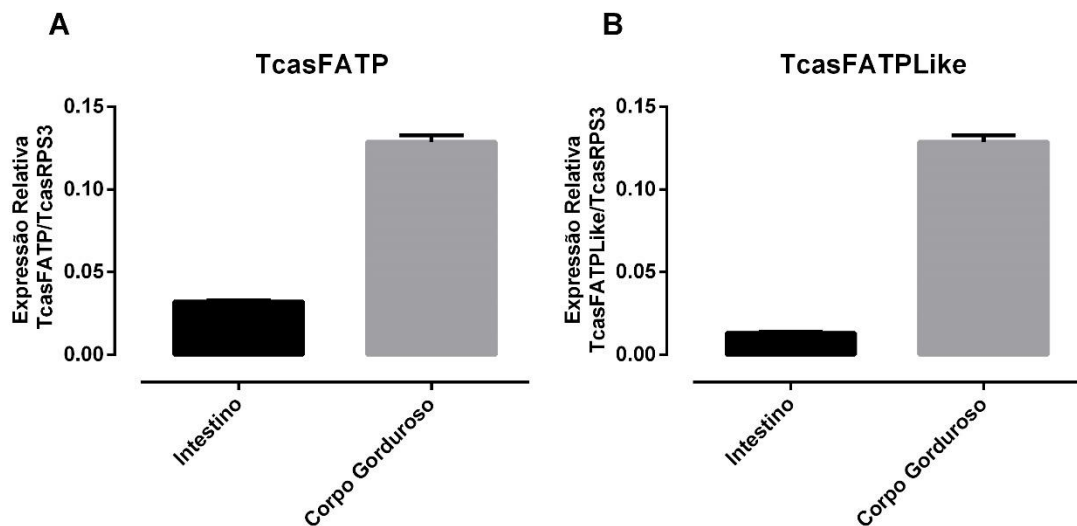


Fonte: Autor, 2018.

Enquanto que TcasFATPLike apresenta expressão predominante somente no estágio P2 (Figura 14B). A fase de pupa é a fase onde o inseto não se alimenta e onde todas as suas modificações metabólicas ocorrem custeadas pelas reservas energéticas do corpo gorduroso, o que pode estar relacionado com possível papel das FATPs na mobilização de energia através da lipólise no corpo gorduroso. Não existem informações na literatura que correlacionem diretamente a função de FATPs com a β -oxidação, mas sugere-se que estas proteínas estejam envolvidas, principalmente devido à sua alta expressão no corpo gorduroso. Em *Rhodnius prolixus*, o silenciamento de uma Acil-CoA sintetase de cadeia longa (RhoprACSL-2) resultou em redução de 90% nas taxas de β -oxidação de ácidos graxos no corpo gorduroso (ALVES-BEZERRA et al., 2016). Como as FATPs pertencem à mesma família das ACS e a maioria das isoformas realizam ativação dos ácidos graxos por adição de coenzima A, o aumento observado da expressão de FATPs em estágios de alta taxa metabólica (Figura 14A e 14B) pode estar relacionado à função de acilação destas proteínas. Ao contrário do descrito para a maioria das FATPs, nem todas exercem suas funções ligadas à membrana. Estudos

com FATP4 em linhagens celulares COS-1 e Neuro2a demonstraram sublocalizações diferentes: retículo endoplasmático e mitocôndria, respectivamente. Estudos *knockout* FATP4 em células Neuro2a demonstraram redução de 17% na ativação de C16:0, enquanto a taxa de absorção de ácidos graxos após o silenciamento não foi afetado, ou seja, evidencia a função proeminente de FATP4 na acilação de ácidos graxos, característica de sua sublocalização na linhagem celular (JIA et al., 2007). Analisando a distribuição tecidual da expressão de FATPs em larvas de *T. castaneum* (Figura 15), os resultados mostram maior expressão no corpo gorduroso, para ambos os genes, mas expressão também é observada no intestino do inseto.

Figura 15: Expressão relativa de TcasFATP (A) e TcasFATPLike (B) em tecidos de larvas de *T. castaneum* por PCR em tempo real. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,001$.



Fonte: Autor, 2018.

Tanto em vertebrados quanto em invertebrados, a expressão de membros da família FATP é tecido-específica, apresentando perfis de expressão e funções diferentes a depender do tecido (ANDERSON & STAHL, 2013; DOURLIN et al., 2015). Em ratos, o perfil de expressão de isoformas de FATP também é tecido-específica, A isoforma 1 (Fatp1) apresenta-se mais expressa no tecido adiposo (função correspondente ao corpo gorduroso em insetos) e está relacionada com o acúmulo de reservas energéticas. Já a isoforma Fatp4 apresenta-se mais expressa no intestino menor, especializada no transporte de ácidos graxos durante a absorção de lipídeos da dieta nos enterócitos (MISHIMA et al., 2011). A isoforma 1 de FATP é o membro da família FATP mais expresso no tecido adiposo em várias espécies e a desregulação da expressão de membros da família FATP tem sido correlacionada com

alterações da homeostase lipídica e com dessensibilização à insulina (BODEN, 1997). Em cultura de células de adipócitos, a translocação da FATP1 de um compartimento intracelular para a membrana plasmática após sinalização por insulina foi correlacionada com aumento da taxa de absorção de ácidos graxos de cadeia longa (STAHL et al., 2002). Mas FATP1 não apresenta expressão somente no tecido adiposo, no músculo esquelético a translocação da proteína de transporte para a membrana por efeito da insulina também ocorre, evidenciando a distribuição tecido-específica das isoformas que depende da função que exercem em cada tecido (WU et al., 2006). Ratos modelo *knockout* para FATP1 no músculo esquelético, hiperinsulinêmicos e hiperglicêmicos, apresentaram-se protegidos dos efeitos da dessensibilização à insulina mesmo sob alimentação rica em lipídeos, efeito associado à perda de função de FATP1 e consequente redução nas taxas de transporte de ácidos graxos (KIM et al., 2004).

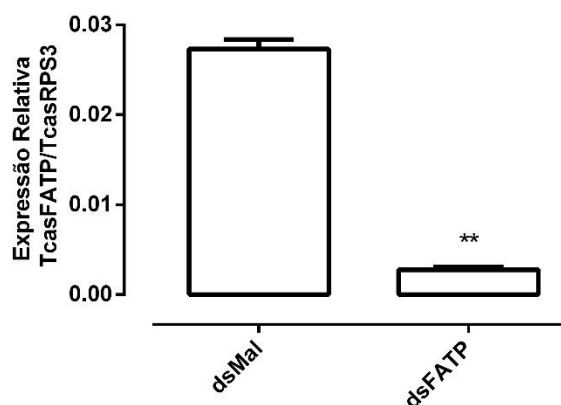
Não existem na literatura estudos que caracterizem a função de FATPs no metabolismo de insetos, porém estudos com *Bombyx mori* também identificaram expressão considerável de FATP no corpo gorduroso de larvas desta espécie, ao contrário do que foi observado no corpo gorduroso de adultos neste mesmo estudo (OHNISHI et al., 2009), evidenciando as diferenças de expressão entre os estágios de desenvolvimento do inseto, como também foi observado na Figura 14. Altos níveis de expressão de FATP também foram observados na glândula de feromônio de *B. mori* adultos, evidenciando o envolvimento de FATPs em órgãos que absorvem grandes porções de ácidos graxos, como intestino, corpo gorduroso e glândulas de feromônio (OHNISHI et al., 2009). Na mariposa *Eilema japonica* e na traça do feijão *Ostrinia scapularis* foi observada a ausência de expressão de FATP no corpo gorduroso de adultos (QIAN et al., 2011), o que sugere que as FATPs tenham papel crucial nos estágios de desenvolvimento do inseto onde há maior mobilização de reservas energéticas, como nas pupas.

5.3 Avaliação dos efeitos da injeção de dsRNA para TcasFATP em larvas de *T. castaneum*

As larvas de 20 dias de idade (L20) que foram injetadas com dsRNA para TcasFATP tiveram a mortalidade e desenvolvimento acompanhados durante 7 dias depois do tratamento. Uma taxa irrelevante de mortalidade foi observada tanto para o grupo controle quanto para o

grupo tratado com dsRNA, nenhuma interferência fenotípica foi observada e o desenvolvimento da pupa e emergência dos insetos adultos manteve-se normal. Após 3 dias, as larvas foram submetidas a extração de RNA total, tratamento com DNase e síntese de cDNA conforme já descrito no item 4.4.2. Posteriormente, a reação de qPCR foi realizada conforme descrito no item 4.4.6 para avaliar o efeito da injeção de dsRNA na expressão do gene TcasFATP. Os resultados do qPCR mostram que um silenciamento de aproximadamente 90% do gene TcasFATP foi alcançado, quando comparado ao grupo controle onde foi injetado o dsRNA para a proteína ligadora de manose (Mal) de *E. coli* (Figura 16).

Figura 16 – Inibição da expressão do gene TcasFATP pela injeção de dsFATP.
 **: Significativamente diferente dos valores dos insetos injetados com a mesma quantidade de dsRNA para Mal por teste t, $p < 0,0001$. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações.

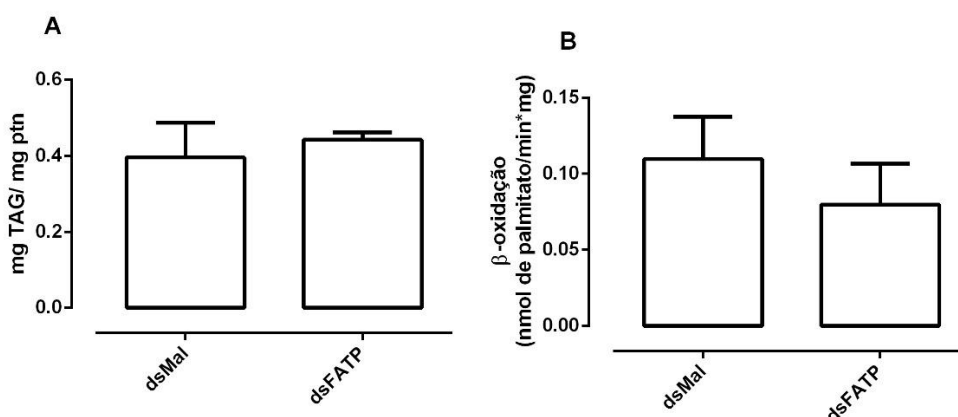


Fonte: Autor, 2018.

Para avaliar o efeito direto do silenciamento do gene TcasFATP na dinâmica energética, a quantificação da concentração total de Triacilglicerol das larvas foi realizada, seguida dos ensaios de β -Oxidação. Os resultados da quantificação de TAG não mostraram diferenças entre as larvas do grupo controle (injeção de dsMal) e do grupo tratado (dsFATP) (Figura 17A), efeito contrário ao esperado. Ohnishi et al. (2009) observou, em *Bombyx mori*, redução do conteúdo de lipídeos armazenados no citoplasma após silenciamento do gene BmFATP utilizando técnicas de coloração com vermelho do Nilo e HPLC. Em *R. prolixus*, o silenciamento de uma enzima ACS de cadeia longa resultou em aumento no conteúdo de TAG do corpo gorduroso após 15 dias, as análises mostraram concomitante redução das taxas de β -oxidação e aumento da síntese *de novo* de lipídeos. A origem do aumento do conteúdo de TAG após o silenciamento foi atribuído à síntese de lipídeos, já que a via de absorção de ácidos graxos proteína-dependente encontrava-se ausente (ALVES-BEZERRA et al., 2016).

A perda da função da proteína ligadora de Acil-CoA (ACBP) em *Caenorhabditis elegans*, proteína com função interligada à da FATP, ocasiona diminuição no conteúdo de Triacilglicerol nas gotículas lipídicas (ELLE et al., 2011). Acredita-se que não foram observados efeitos na concentração de TAG em larvas *knockout* para TcasFATP neste estudo devido ao processamento da amostra, pois os ensaios foram realizados utilizando o corpo total das larvas, sem dissecação para análise específica do conteúdo de TAG nos tecidos, principalmente no corpo gorduroso. Também não foram observadas alterações significativas nas taxas de β -oxidação entre o grupo controle e o grupo silenciado com dsTcasFATP (Figura 17B). As taxas de β -oxidação também foram quantificadas utilizando o corpo total das larvas, sem haver separação dos tecidos o que prejudicou a observação dos reais efeitos. Alves-Bezerra et al. (2016) silenciou o gene codificante de Acil-CoA Sintase de cadeia longa 2 (RhoprACSL2) e para avaliar o efeito do metabolismo lipídico, quantificou o conteúdo de Triacilglicerol, as taxas de síntese *de novo* de lipídeos e as taxas de β -oxidação; os resultados encontrados mostraram que não houve efeito sobre a síntese *de novo* de lipídeos, mas foi observado aumento do conteúdo de TAG estocado no corpo gorduroso como resultado do bloqueio de 90% das taxas de β -oxidação neste tecido. As enzimas Acil-CoA sintase catalisam a ativação de ácidos graxos de cadeia longa por adição de Coenzima A e afetam a absorção de ácidos graxos exógenos, essa reação de acilação vetorial aprisiona o ácido graxo dentro da célula e o direciona para a etapa de β -oxidação (EHEHALT et al., 2006). Dessa forma, com o silenciamento do gene RhoprACSL2 a ativação em Acil-CoA é bloqueada e os ácidos graxos não conseguem ser utilizados como fonte energética durante a β -oxidação. A maioria das isoformas de FATP possuem atividade Acil-CoA Sintase e exercem sua função nas reações de acilação, contribuindo muito pouco com o mecanismo de transporte saturável de ácidos graxos através da membrana (BLACK & DIRUSSO, 2003; JIA et al., 2007). A correlação entre a atividade ACS e as reações de β -oxidação também foi evidenciada em ratos, onde o silenciamento de uma Acil-CoA de cadeia longa 1 (ACSL1) reduziu em 50% a expressão de genes envolvidos na β -oxidação, como o gene codificante para Acil-Carnitinas (Li et al., 2009).

Figura 17 - Efeito na concentração de Triacilglicerol em larvas após injeção de dsFATP (A); Taxas de β -oxidação em larvas após injeção de dsFATP (B).



Fonte: Autor, 2018.

5.4 Avaliação dos efeitos do Orlistate® (tetraidrolipstatina) nos índices nutricionais, triacilglicerol e expressão de genes relacionados

As larvas do grupo controle e as alimentadas com farinha de trigo incorporada com Orlistate tiveram seu peso e mortalidade avaliados ao longo de 96h. Inicialmente foram calculados os índices nutricionais dos grupos testados. Os resultados da taxa de consumo relativo (RCR), maior no grupo tratado, mostram que houve aumento da ingestão de alimento pelas larvas que tinham Orlistate em sua alimentação. Uma taxa maior de consumo de alimento no grupo tratado com Orlistate pode estar relacionado à uma maior ingestão de alimento a fim de compensar a redução da absorção de lipídeos da dieta causada pelo fármaco. Além disso, foi observado uma taxa de crescimento semelhante para os grupos estudados. A eficiência de conversão de alimento (ECI) também foi avaliada e os resultados demonstram uma redução da eficiência no grupo tratado com Orlistate (19,58%), efeito possivelmente relacionado à inibição da absorção de lipídeos da dieta por bloqueio da ação das lipases intestinais por ação do fármaco (Tabela 3).

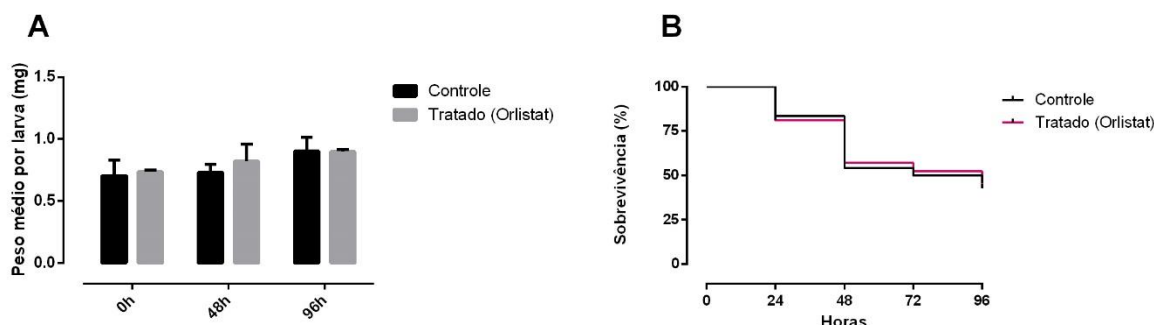
Tabela 3 - Análise dos Índices nutricionais da larva do *Tribolium castaneum* em tratamento com Orlistate após 96h. RGR = Taxa de crescimento relativo, RCR = taxa de consumo relativo, ECI = eficiência da conversão de alimento ingerido. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t e a representação com letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, $p < 0,0001$.

	CONTROLE			TRATAMENTO		
	RGR	RCR	ECI (%)	RGR	RCR	ECI (%)
Orlistate 0,1mg/mg de farinha	0,068a	0,147 ^a	46,5%	0,0554 ^a	0,283b	19,58%

Fonte: Autor, 2018.

Os dados de mortalidade mostram que não houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência entre os grupos controle e tratado, aparentemente demonstrando que o uso de um inibidor de lipase não provocou mortalidade significativa (Figura 18B), ou seja, mesmo com menor aporte de lipídeos vindos da dieta, os insetos conseguiram manter a sobrevivência em taxas normais. Muitos estudos em animais têm esclarecido a relação entre estoques de lipídeos e longevidade. Em *D. melanogaster*, a indução de genes componentes da via de β -oxidação aumentou a longevidade dos insetos por aumentar a tolerância às condições de stress. Quanto ao peso, não foram observadas diferenças significativas no peso médio das larvas ocasionadas pelo tratamento com Orlistate em comparação ao grupo controle (Figura 18A).

Figura 18 – Peso médio de larvas tratadas com Orlistate (0,1mg/mg de farinha) frente ao grupo controle (A); Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (B). As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA duas vias.

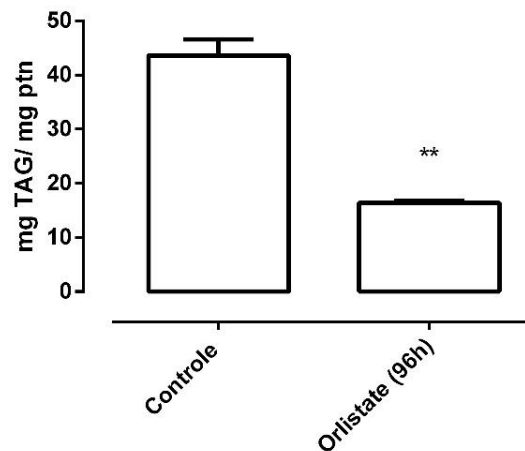


Fonte: Autor, 2018.

Os mesmos grupos de larvas utilizados para acompanhar a mortalidade e peso médio foram testados quanto aos níveis de Triacilglicerol (TAG) e quanto à expressão de FATPs por

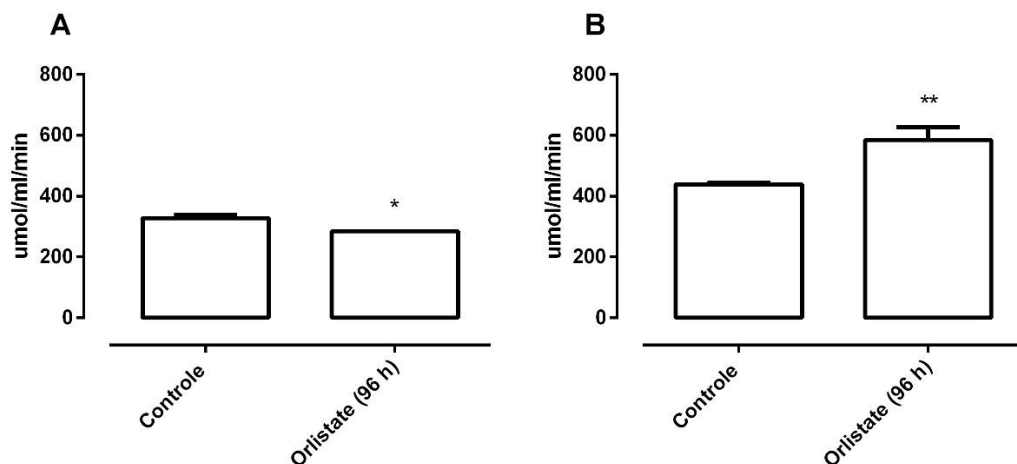
PCR em tempo real. Os níveis de triacilglicerol presente em homogenatos de larvas (padrozinados por mg de proteína do extrato) mostraram redução significativa na concentração de TAG nas larvas tratadas com tetraidroliostatina quando comparadas ao controle (Figura 19). A diminuição observada nos níveis de TAG em larvas tratadas sugere que a inibição da digestão de triacilglicerol oriundos da dieta (~2,5%) aparentemente impulsiona vias endógenas de mobilização de ácidos graxos a partir do triacilglicerol estocado no corpo gorduroso através da lipólise, efeito também observado nas taxas de ECI, onde a eficiência de conversão de alimento apresenta-se reduzida devido à diminuição da absorção de lipídeos e necessidade de mobilização interna. Para manutenção das taxas metabólicas em resposta à diminuição do aporte energético ingerido, as vias metabólicas são reorganizadas para manter a homeostase. A maior parte das reservas energéticas em insetos estão na forma de triacilglicerol no corpo gorduroso e situações metabólicas como stress, reprodução, períodos de jejum e ovogênese na maioria das vezes são custeadas por essas reservas, garantindo a sobrevivência mesmo em condições adversas (DJAWDAN et al., 1998; HANSEN et al., 20013). Para avaliar as taxas de mobilização de ácidos graxos do corpo gorduroso através da lipólise, a atividade lipásica foi quantificada no intestino e corpo gorduroso das larvas tratadas (Figura 20). Os resultados mostraram que a atividade lipásica intestinal apresenta redução estatisticamente comprovada após o tratamento (Figura 20A), efeito relacionado à inibição enzimática causada pelo fármaco. Já a atividade lipásica do corpo gorduroso (Figura 20B) apresenta-se elevada após o tratamento, o que sustenta a hipótese de que a lipólise se encontra ativada após inibição da lipase intestinal para compensação metabólica. Dessa forma, considera-se que a diminuição na absorção de ácidos graxos por efeito do fármaco na alimentação, considerada aqui como uma condição de stress, pode direcionar as vias metabólicas para o consumo dos estoques de triacilglicerol para manutenção da sobrevivência (Figura 19). Em *Drosophila melanogaster*, observou-se uma forte relação positiva entre os estoques de lipídeos, estoques de carboidrato e a maior resistência às condições de stress (DJAWDAN et al., 1998). Destacando a importância do corpo gorduroso como estoque de triacilglicerol, Judd et al. (2011) submeteu gafanhotos à ovariectomia e observou como efeito a hipertrofia do corpo gorduroso, justificada pela ausência do processo de ovogênese. Hipertrofia do corpo gorduroso também foi observada em fêmeas estéreis mutantes de *D. melanogaster*, que após receberem implantação de ovários da linhagem selvagem restabeleceram as características normais do tecido (DOANE, 1961).

Figura 19 – Quantificação de Triacilglicerol (TAG) em larvas de grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações independentes. **: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,0001$.



Fonte: Autor, 2018.

Figura 20 – Quantificação da atividade lipásica no intestino (A) e no corpo gorduroso (B) de larvas de grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,005$; **: $p < 0,0001$.



Fonte: Autor, 2018.

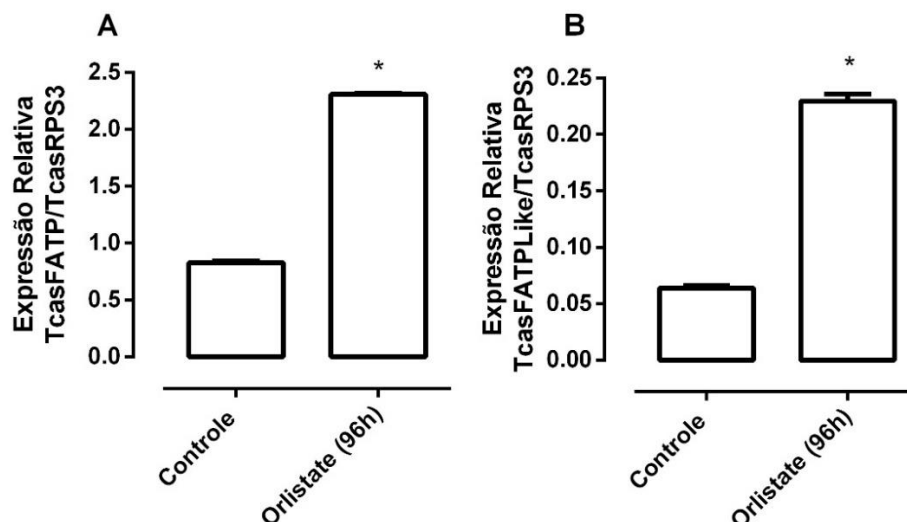
Em larvas tratadas com Orlistate, a análise da expressão relativa dos genes TcasFATP e TcasFATPLike por PCR em tempo real mostra aumento significativo da expressão de ambos os genes após 96 horas de tratamento (Figura 21A e 21B). Porém, a expressão relativa do gene TcasFATPLike (Figura 21B) aumenta com mais intensidade em larvas tratadas com

Orlistate. Sugere-se que o aumento da expressão desses genes ocorre como mecanismo compensatório para a diminuição da captação de ácidos graxos da dieta causada pelo Orlistate, como forma de suprir as células com mais transportadores disponíveis a fim de normalizar a captação desses lipídeos e consequentemente manter o aporte energético necessário para as células.

Diante do bloqueio da captação de ácidos graxos vindos da dieta, neste caso provocado pelo Orlistate, o metabolismo sofre desvio para ativação de outras vias metabólicas paralelas a fim de manter o suprimento de lipídeos para a produção de energia dentro das células (LIU et al., 2010). Dessa forma, a síntese de novo de ácidos graxos ou a β -oxidação de lipídeos armazenados no corpo gorduroso podem ser ativadas (AMEER et al., 2014). Já foi observado em *Drosophila melanogaster* que a β -oxidação de ácidos graxos ativa a lipólise no corpo gorduroso (KISHITA et al., 2012), o que sugere que em insetos o transporte de ácidos graxos para fora dos adipócitos com destino à β -oxidação também é ativado. O aumento observado na atividade lipásica no corpo gorduroso das larvas após o tratamento com Orlistate (Figura 20B), sugere que a intensa mobilização das reservas de Triacilglicerol do corpo gorduroso devem ser direcionadas para a via de β -oxidação em *T. castaneum*, como forma de compensação energética. No tecido adiposo subcutâneo de mamíferos, quando na ausência da proteína FATP4, as enzimas lipolíticas não são afetadas, o que sugere que a lipólise permanece ativa mesmo quando o tráfico de ácidos graxos é alterado (LENZ et al., 2011).

O fármaco Orlistate tem seu mecanismo baseado na inibição da lipase pancreática (HECK et al, 2000) e em níveis moleculares também é capaz de inibir a enzima Ácido Graxo Sintase (ACS) envolvida na síntese *de novo* de lipídeos, impedindo a biossíntese de lipídeos e ativando a hidrólise de triacilglicerol estocados no tecido adiposo (FAKO et al., 2014). Enzimas ácido graxo sintase já foram identificadas em alguns insetos (LUMMEN et al., 2014), mas existem poucas informações sobre a síntese *de novo* nesses animais. Dessa forma, sugere-se que a captação de ácidos graxos da dieta pode estar reduzida nas larvas alimentadas com Orlistate e a via de síntese *de novo* de lipídeos possivelmente encontra-se inativa por efeito do fármaco, como sugere a literatura. Assim, sugere-se a hipótese de que o metabolismo possivelmente seja deslocado para ativação da hidrólise de triacilglicerol no corpo gorduroso, a fim de fornecer ácidos graxos como substrato para a β -oxidação nos tecidos com alta demanda energética

Figura 21 - Expressão relativa de TcasFATP (A) e TcasFATPLike (B) em larvas de grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,05$.



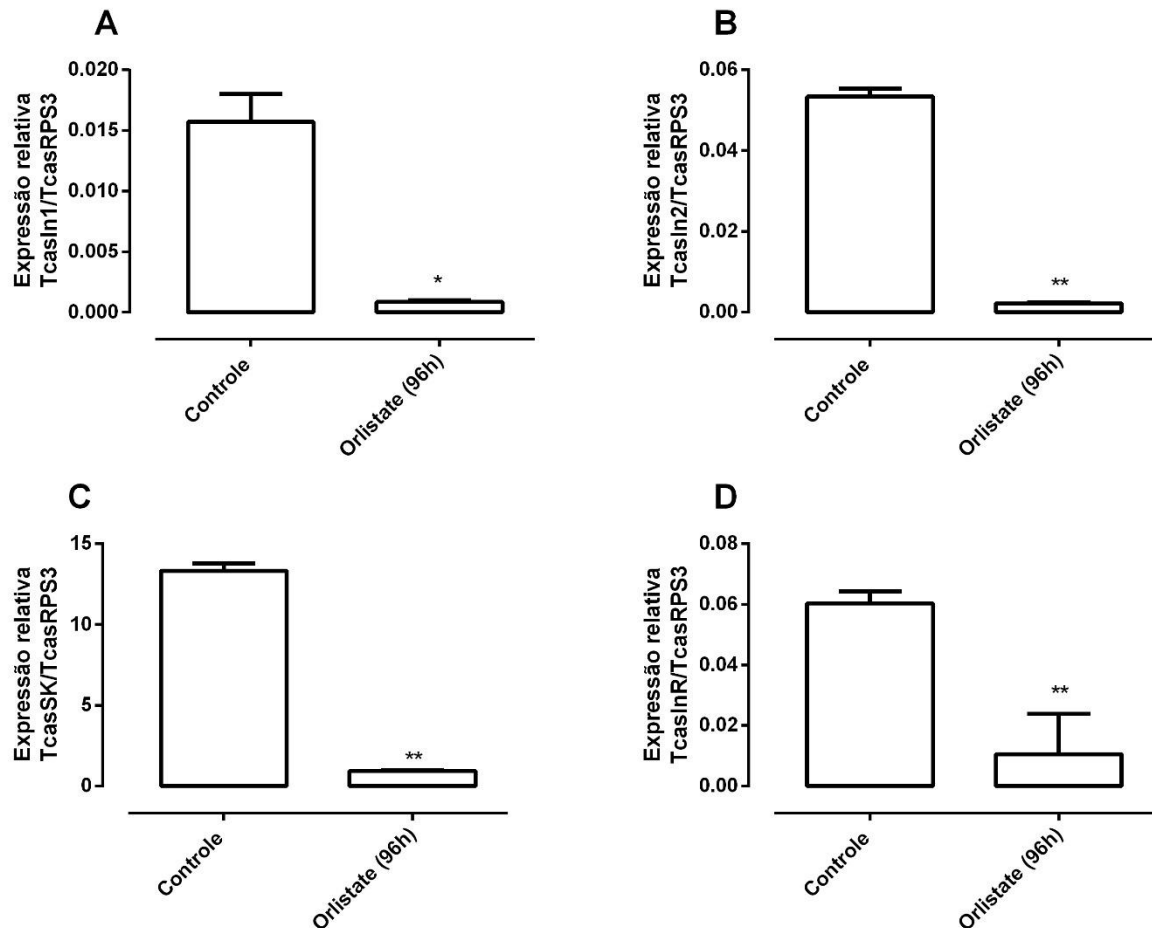
Fonte: Autor, 2018.

Esta hipótese é sustentada pelos resultados demonstrados neste trabalho, na Figura 19 observou-se a diminuição da concentração de triacilglicerol nas larvas tratadas, sendo o efeito causado possivelmente pela ativação da lipólise, também sugerida pelos resultados da figura 20B, onde a atividade lipásica é estimulada após o tratamento com o Orlistate.

Foi realizada a caracterização da expressão dos genes relacionados após o tratamento com Orlistate. A expressão do gene Sulfakinina (TcasSK) e dos genes codificantes para insulina (TcasIn1 e TcasIn2) foram quantificados na cabeça das larvas tratadas. E a expressão do gene codificante para receptor de insulina (TcasInR) foi quantificada utilizando o corpo total das larvas (Figura 22).

A regulação das taxas de alimentação em insetos ocorre por um sistema complexo, por ação de peptídeos semelhantes à insulina (In) e de neuropeptídios importantes, como as Sulfakininas (SK). As sulfakininas são neuropeptídeos que ao serem liberados, inibem a ingestão de alimento pelo inseto, agindo de forma semelhante ao sistema de saciedade Gastrina/Colecistoquinina de mamíferos (DOWNER et al., 2007; LIN et al., 2016).

Figura 22 - Expressão relativa de TcasIn1 (A), TcasIn2 (B), TcasSK (C) em cabeça de larvas e TcasInR (D) em tecido de larva total. Resultados para grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média $\pm$ erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,05$; **: $p < 0,001$.



Fonte: Autor, 2018.

Em *T. castaneum*, já foi observado que quando há o silenciamento do gene codificante para a sulfakinina, ocorre aumento da ingestão de alimento pelo inseto, evidenciando seu papel na saciedade (YU et al., 2013a; YU et al., 2013b). Neste trabalho, após o tratamento realizado com Orlistate nas larvas, observou-se que a expressão para 2 peptídeos semelhantes à insulina (In1 e In2) reduziram drasticamente (Figura 22A e 22B), assim como a expressão de sulfakininas (Figura 22C) e de receptores de insulina periféricos (InR) (Figura 22D). Os dados sugerem que as vias de sinalização de sulfakininas e peptídeos semelhantes à insulina neste inseto se sobrepõem, como já observado em *Drosophila melanogaster*, onde esses dois genes são co-expressos por células cerebrais (LIN et al., 2016). Em insetos, as vias de fluxo de

energia são bem semelhantes à de mamíferos. Após a alimentação, quando há altos níveis de açúcar circulante na hemolinfa, são liberados peptídeos semelhantes à insulina que exercem efeito semelhante à insulina em mamíferos (GRAHAM & PICK, 2017). Estudos em *D. melanogaster* utilizando dieta rica em açúcar, indicam que a resistência à insulina também pode ocorrer em insetos, acompanhada do aumento dos níveis de lipídeos e da superexpressão de receptores para insulina, o que sugere que as vias metabólicas e os genes relacionados com a fisiopatologia do diabetes tipo 2 possam ser estudadas em insetos (MUSSELMAN et al., 2013). A obesidade é o principal fator fisiopatológico associado ao Diabetes mellitus tipo 2 (FRÜHBECK et al., 2013). A farmacoterapia com Orlistate é muito utilizada no tratamento da obesidade e quando é alcançada a redução de peso de cerca de 5-10% é observado um melhor controle glicêmico, lipídico e da pressão arterial em pacientes com Diabetes tipo 2 (CHUKIR et al., 2018). Esse melhor controle possivelmente está relacionado à redução da resistência à insulina, condição típica desses pacientes, devido à redução dos níveis de lipídeos, principalmente das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). A redução nos lipídeos totais parece estar associada à maior sensibilidade dos receptores de insulina e melhor controle glicêmico (MILES et al., 2002; CHUKIR et al., 2018). Os resultados apresentados neste trabalho indicam que, em *T. castaneum*, o tratamento com Orlistate provoca a redução das reservas de Triacilglicerol (Figura 19) e intensifica a ação de lipases no corpo gorduroso (Figura 20B), o que ocasiona maior sensibilidade dos tecidos larvais à insulina, sendo necessários menores concentrações de In1 e In2 e do respectivo receptor (InR) para manutenção da homeostase (Figura 22). Adicionalmente, a redução na expressão de Sulfakininas (Figura 22C) ocorre como mecanismo de feedback para aumentar o consumo de alimentos pelas larvas (Tabela 3) a fim de compensar a diminuição da captação de lipídeos da dieta por efeito do fármaco. Portanto, diante dos resultados apresentados, o inseto *T. castaneum* demonstra ser um modelo válido para estudo de vias metabólicas e genes relacionados à resistência à insulina e obesidade.

6 CONCLUSÃO

Os resultados descritos neste trabalho demonstram a presença de 2 genes codificantes para Proteínas Transportadoras de Ácidos Graxos (FATPs) no genoma de *T. castaneum*, que são expressas principalmente no corpo gorduroso das larvas, mas também no intestino desses insetos. As diferenças no perfil de expressão entre os estágios de desenvolvimento do inseto demonstram a importância dessas proteínas durante cada fase, principalmente nas fases onde há maior consumo dos estoques de lipídeos, como é o caso do estágio de pupa. Evidência que sugere sua participação direta no metabolismo de lipídeos, principalmente nos períodos de alta demanda energética.

O silenciamento do gene TcasFATP em larvas de *T. castaneum* foi alcançado, mas efeitos pronunciados na estocagem de lipídeos e nas taxas de β -oxidação não foram observados, sendo necessário a repetição dos testes com tecidos específicos do inseto, considerando um processamento mais adequado das amostras.

O uso de um inibidor de lipase comercial (Orlistate) possibilitou observar as flutuações na expressão dos genes TcasFATP e TcasFATPLike. Além disso, as vias de regulação da ingestão de alimento que envolve a expressão de sulfakininas e peptídeos semelhantes à insulina também foram caracterizadas, o que sugere que as Proteínas Transportadoras de Ácidos Graxos devem ter a expressão regulada pela alimentação e são sujeitas às suas vias de regulação.

Diante dos resultados encontrados neste trabalho e na literatura, o *T. castaneum* representa um modelo invertebrado válido para estudos de interação organismo-meio ambiente, principalmente em relação à interferência de fármacos no metabolismo. São organismos simples, de baixo custo de manutenção e representam uma ferramenta acessível para estudos de triagem de compostos químicos, principalmente para doenças metabólicas lipídicas. Os modelos invertebrados podem contribuir bastante para compreensão dos mecanismos moleculares da família FATP (DOURLEN et al., 2015; GRÜNWALD et al., 2013).

REFERÊNCIAS

AKAM, M. Hox and Hom: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. **Cell**. v.57, p.347-354, 1989.

ALABASTER, A.; ISOE, J.; ZHOU, G. et al. Deficiencies in acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase 1 differentially affect eggshell formation and blood meal digestion in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 41, n. 12, p. 946-955, 2011.

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R.; FERREIRA, L. G.; COSTA, A. R.; PIMENTEL, M. A. G. Qualidade de milho armazenado e infestado por *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum*. **Engenharia na Agricultura**. v.19, p.9-18, 2011.

ALVES-BEZERRA, M.; GONDIM, K. C. Triacylglycerol biosynthesis occurs via the glycerol-3-phosphate pathway in the insect *Rhodnius prolixus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1821, p. 1462-1471, 2012.

ALVES-BEZERRA, M.; MAJEROWICZ, D.; GRILLO, L. A. M. et al. Serotonin regulates an acyl-CoA-binding protein (ACBP) gene expression in the midgut of *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 40, n. 2, p. 119-125, 2010.

ALVES-BEZERRA, M.; DE PAULA, I. F. 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. *in press*, 2015.

ALVES-BEZERRA, M.; KLETT, E. L.; DE PAULA, I. F. et al. Long-chain acyl-CoA synthetase 2 knockdown leads to decreased fatty acid oxidation in fat body and reduced reproductive capacity in the insect *Rhodnius prolixus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1861, p. 650–662, 2016.

AMEER, F.; SCANDIUZZI, L.; HASNAIN, S. et al. De novo lipogenesis in health and disease. **Metabolism**. v. 63, n. 7, p. 895-902, 2014.

ANDERSON, C. M.; STAHL, A. SLC27 fatty acid transport proteins. **Molecular Aspects of Medicine**. v.34, p. 516-528, 2013.

ARAÚJO, R. A.; GUEDES, R. N.; OLIVEIRA, M. G.; FERREIRA, G. H. Enhanced activity of carbohydrate- and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Bulletin of Entomological Research**. v. 4, p. 417-424, 2008.

ARRESE, E. L.; CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; PENNINGTON, J. E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.31, p.7-17, 2001.

ARRESE, E. L.; ROJAS-RIVAS, B. I.; WELLS, M. A. The use of decapitated insects to study lipid mobilization in adult *Manduca sexta*: Effects of adipokinetic hormone and trehalose on fat body lipase activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 26, n. 8-9, p. 775-782, 1996.

AUINGER, A.; VALENTI, L.; PFEUFFER, M. et al. A promoter polymorphism in the liver-specific fatty acid transport protein 5 is associated with features of the metabolic syndrome and steatosis. **Hormone and Metabolic Research**. v. 42, p. 854-859, 2010.

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 MARREWIK, 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.

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

BLACK, P. N.; DIRUSSO, C. C. Transmembrane Movement of Exogenous Long-Chain Fatty Acids: Proteins, Enzymes, and Vectorial Esterification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, p. 454-472, 2003.

BLACK, P. N.; DIRUSSO, C. C. Vectorial acylation: linking fatty acid transport and activation to metabolic trafficking. **Novartis Foundation Symposium**. v. 286, p. 127-138, 2007.

BLACKLOCK, B. J.; RYAN, R. O. Hemolymph lipid transport. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.24, p.855–873, 1994.

BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biological**. v.294, p. 1351-1362, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

CANAVOSO, L. E.; JOUNI, Z. E.; KARNAS, K. J.; PENNINGTON, J. E.; WELLS, M. A. Fat Metabolism in Insects. **Annual Review of Nutrition**. v.21, p.23–46, 2001.

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.

CICCARELLI, F. D.; VON MERING, C.; SUYAMA, M. et al. Complex genomic rearrangements lead to novel primate gene function. **Genome Research**. v. 15, p. 343–351, 2005.

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.

CHUKIR, T.; SHUKLA, A. P.; SAUNDERS, K. H.; ARONNE, L. J. Pharmacotherapy for obesity in individuals with type 2 diabetes. **Expert Opinion of Pharmacotherapy**. v. 19, p. 223-231, 2018.

COE, N. R.; SMITH, A. J.; FROHNERT, B. I. et al. The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p. 36300-36304, 1999.

DABORN, P. J.; YEN, J. L.; BOGWITZ, M. R. et al. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. **Science**. v. 297, p. 2253–2256, 2002.

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

DIRUSSO, C. C.; DARWIS, D.; OBERMEYER, T.; BLACK, P. N. Functional domains of the fatty acid transport proteins: Studies using protein chimeras. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1781, p.135-143, 2008.

DIRUSSO, C. C.; LI, H.; DARWIS, D. et al. Comparative biochemical studies of the murine fatty acid transport proteins (FATP) expressed in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 16829-16837, 2005.

DJAWDAN, M.; CHIPPINDALE, A. K.; ROSE, M. R.; BRADLEY, T. J. Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. **Physiological Zoology**. v. 71, p. 584-594, 1998.

DOANE, W. W. Developmental physiology of the mutant female sterile(2)adipose of *Drosophila melanogaster*. III. Corpus allatum-complex and ovarian transplantations. **The Journal of Experimental Zoology**. v. 146, p. 275-298, 1961.

DOEGE, H.; STAHL, A. Protein-Mediated Fatty Acid Uptake: Novel Insights from In Vivo Models. **Physiology**. v.21, p. 259–268, 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, 8p, 2013.

DOURLIN, P.; BERTIN, B.; CHATELAIN, G. et al. *Drosophila* Fatty Acid Transport Protein Regulates Rhodopsin-1 Metabolism and Is Required for Photoreceptor Neuron Survival. **Plos Genetics**. v. 8, p. 1-12, 2012.

DOURLIN, 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.

DOWNER, K. E.; HASELTON, A. T.; NACHMAN, R. J.; STOFFOLANO JR., J. G. Insect satiety: sulfakinin localization and the effect of drosulfakinin on protein and carbohydrate ingestion in the blow fly, *Phormia regina* (Diptera: calliphoridae). **Journal of Insect Physiology**. v. 53, p.106–112, 2007.

ECK, R. V.; DAYHOFF, M. O. Atlas of Protein Sequence and Structure. In: FOUNDATION, N. B. R. (Ed.). Maryland: Silver Springs, 1966.

EHEHALT, R.; FULLEKRUG, J.; POHL, J. et al. Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.284, p. 135-140, 2006.

ELIAS, M.C.; LORINI, I.; OLIVEIRA, M.; MORÁS, A.; SCHIAVON, R.A. Pragas e microorganismos no armazenamento de grãos e derivados. In: ELIAS, Moacir Cardoso. **Manejo tecnológico da secagem e do armazenamento de grãos**. Ed. Santa Cruz. Pelotas, 2008.

ELLE, I. C.; SIMONSEN, K. T.; OLSEN, L. C. et al. Tissue- and paralogue-specific functions of acyl-CoA-binding proteins in lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. **The Biochemical Journal**. v. 437, p. 231-241, 2011.

FAKO, V. E.; ZHANG, J. T.; LIU, J. Y. Mechanism of Orlistat Hydrolysis by the Thioesterase of Human Fatty Acid Synthase. **ACS Catalysis**. v. 4, p. 3444–3453, 2014.

FARONI, L. R.; FRABETTI, D. R. Principais pragas de grãos armazenados. **.Net**, Minas Gerais, out. 2009. Disponível em: <<http://www.centreinvar.org.br>>. Acesso em: 10 de jun. 2017.

FONTES, L. S.; ALMEIDA FILHO; A. J.; ARTHUR, V. Danos causados por *Sitophilus oryzae* (Linné, 1763) e *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.70, n.3, p.303-307, 2003.

FRÜHBECK, G.; TOPLAK, H.; WOODWARD, E. et al. Obesity: the gateway to ill health – an EASO position statement on a rising public health, clinical and scientific challenge in Europe. **Obesity Facts**. v. 6(2), p.117–120, 2013.

GÄDE, G.; AUERSWALD, L. Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. **General and Comparative Endocrinology**. v. 132, p. 10-20, 2003.

GÄDE, G.; AUERSWALD, L.; MARCO, H. G. Flight fuel and neuropeptidergic control of fuel mobilisation in the twig wilting, *Holopterna alata* (Hemiptera, Coreidae). **Journal of Insect Physiology**. v. 52, n. 11-12, p. 1171-1181, 2006.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 920 p, 2002.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C. et al. **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server**. In: WALKER, J. M. (Ed.). The Proteomics Protocols Handbook: Humana Press, 2005. p.571-60.

GERTOW, K.; BELLANDA, M.; ERIKSSON, P. et al. Genetic and structural evaluation of fatty acid transport protein-4 in relation to markers of the insulin resistance syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v.89, p. 392-399, 2004.

GOLDRING, J. P.; READ, J. S. Insect acetyl-CoA carboxylase: enzyme activity during adult development and after feeding in the tsetse fly, *Glossina morsitans*. Comparative Biochemistry and Physiology. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 108, n. 1, p. 27-33, 1994.

GOLODNE, D. M.; VAN HEUSDEN, M. C.; GONDIM, K. C. et al. Purification and characterization of a lipid transfer particle in *Rhodnius prolixus*: phospholipid transfer. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.31, p. 563-571, 2001.

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.

GONDIM, K. C.; WELLS, M. A. Characterization of lipophorin binding to the midgut of larval *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.30, p.405–413, 2000.

GRAHAM, P.; PICK, L. *Drosophila* as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. **Current Topics in Developmental Biology**. v. 121, p.397-419, 2017.

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.

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.

HALL, A. M.; WICZER, B. M.; HERRMMAN, T. et al. Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of acyl-CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 11948-11954, 2005.

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.

HECK, A. M.; YANOVSKI, J. A.; CALIS, K. A. Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. **Pharmacotherapy**. v. 20, p. 270–279, 2000.

HIROKAWA, T.; BOON-CHIENG, S.; MITAKU, S. SOSUI: Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**. v. 14, n. 4, p. 378-379, 1998.

HOFFMAN, A. G. D.; DOWNER, R. G. H. End product specificity of triacylglycerol lipases from intestine, fat body, muscle and haemolymph of the American cockroach, *Periplaneta Americana*. **Lipids**. v.14, p.893-899, 1979.

JIA, Z.; PEI, Z.; MAIGUEL, D. et al. The fatty acid transport protein (FATP) Family: Very long chain Acyl-CoA synthetases or solute carriers?. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 33, p. 25-31, 2007.

KAGE-NAKADAI, E.; KOBUNA, H.; KIMURA, M. et al. Two very long chain fatty acid acyl-CoA synthetase genes, acs-20 and acs-22, have roles in the cuticle surface barrier in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**. v.5, 2010.

KARLSON, P. New concepts on the mode of action of hormones. **Perspectives in Biology and Medicine**. v.6, p.203-214, 1963.

KAZANTZIS, M.; STAHL, A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1821, p. 852–857, 2011.

KISHITA, Y.; TSUDA, M.; AIGAKI, T. Impaired fatty acid oxidation in a *Drosophila* model of mitochondrial trifunctional protein (MTP) deficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 419, n. 2, p. 344-349, 2012.

KROGH, A.; LARSSON, B.; HEIJNE, G. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**. v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.

KUNIEDA, T.; FUJIYUKI, T.; KUCHARSKI, R.; FORET, S.; AMENT, S.A.; TOTH, A.L.; OHASHI, K.; TAKEUCHI, H.; KAMIKOUCHI, A.; KAGE, E.; MORIOKA, M.; BEYE, M.; KUBO, T.; ROBINSON, G. E.; MALESZKA, R. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. **Insect Molecular Biology**. v.15, p.563–576, 2006.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**. v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LAPPAS, M. Effect of pre-existing maternal obesity, gestational diabetes and adipokines on the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue. **Metabolism**. v. 63, p.250-262, 2014.

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

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 6. ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 839p.

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.

LENZ, L. S.; MARX, J.; CHAMULITRAT, W. et al. Adipocyte-specific Inactivation of Acyl-CoA Synthetase Fatty Acid Transport Protein 4 (Fatp4) in Mice Causes Adipose Hypertrophy and Alterations in Metabolism of Complex Lipids under High Fat Diet. **Journal of Biological Chemistry**. v.286, p.35578-35587, 2011.

LEWIS, S. E.; LISTENBERGER, L. L.; ORY, D. S. et al. Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 37042-37050, 2001.

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, H.; LIU, J. Y.; WU, X. et al. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/ prognosis marker. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 1, n.1, p.69–89, 2010.

LIVAK, K. ;SCHMITTGEN, T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** (San Diego, Calif.), v.25, n.4, p.402-082001.

LORENZ, M. W.; ANAND, A. N. Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 56, n. 3, p. 110-119, 2004.

LORINI, I. Aplicação do manejo integrado de pragas em grãos armazenados,. In: Simpósio de Proteção de Grãos Armazenados, 1993. Passo Fundo, RS. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa – CNPT, 1993. p. 117 – 126.

LÜMMEN, P.; KHAJEHALI, J.; LUTHER, K. et al. The cyclic keto-enol insecticide spirotetramat inhibits insect and spider mite acetyl-CoA carboxylases by interfering with the carboxyltransferase partial reaction. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 55, p. 1-8, 2014.

MAEDA, N.; SHIMOMURA, I.; KISHIDA, K. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nature Medicine**. v. 8, p. 731-737, 2002.

MAJEROWICZ, D. **Estudo da expressão gênica da Proteína Ligadora de Acil-Coenzima A 1 de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) e sua inibição por RNA de interferência.** Dissertação (Mestrado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MARANHÃO, Z. G. **Entomologia Geral**. 2ª edição, São Paulo, Nobel, 1977.

MARTIN, G.; POIRIER, H.; HENNUYER, N. et al. Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective rexinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, p. 12612-12618, 2000.

MEIRHAEGHE, A.; MARTIN, G.; NEMOTO, M. et al. Intronic polymorphism in the fatty acid transport protein 1 gene is associated with increased plasma triglyceride levels in a French population. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v.20, p.1330-1334, 2000.

MEMON, R. A.; FEINGOLD, K. R.; MOSER, A. H. et al. Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines. **American Journal of Physiology**. v. 274, p. 210–217, 1998.

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.

METCALF, R.; KRYSAN, J. L.; MILLER, T. A. Methods for the study of pest *Diabrotica*. Springer Science & Business Media. 2012.

MIHALIK, S. J.; STEINBERG, S. J.; PEI, Z.; PARK, J. H.; KIM, D. G. et al. Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. **Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p.24771–79, 2002.

MILES, J. M.; LEITER, L.; HOLLANDER, P. et al. Effect of orlistat in overweight and obese patients with type 2 diabetes treated with metformin. **Diabetes Care**. v. 25(7), p.1123–1128, 2002.

MILGER, K.; HERRMANN, T.; BECKER, C. et al. Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. **Journal of Cell Science**. v. 119, p. 4678-4688, 2006.

MISHIMA, T.; MINER, J. H.; MORIZANE, M. et al. The expression and function of fatty acid transport protein-2 and -4 in the murine placenta. **PLoS One**. v.6, p. 1-8, 2011.

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

MUSSELMAN, L. P.; FINK, J. L.; RAMACHANDRAN, P. V.; PATTERSON, B. W.; OKUNADE, A. L.; MAIER, E.; BARANSKI, T. J. Role of fat body lipogenesis in protection

against the effects of caloric overload in *Drosophila*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 288(12), p. 8028–8042, 2013.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends in Biochemical Sciences**. v.24, p. 34-36, 1999.

NEGRISOLI-JÚNIOR, A. S.; SILVA, E. S.; NEGRISOLI, C. R. B.; SANTOS, N. L., GUZZO, E. C. **Criação em laboratório da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) visando pesquisas para o controle das suas larvas**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2011. 6p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico, 116).

NICHOLS, Z.; VOGT, R. G. The SNMP/CD36 gene family in Diptera, Hymenoptera and Coleoptera: *Drosophila melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, and *Tribolium castaneum*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 38, n. 4, p. 398-415, 2008.

NIOT, I.; POIRIER, H.; TRAN, T. T.; BESNARD, P. Intestinal absorption of long-chain fatty acids: evidence and uncertainties. **Progress in Lipid Research**.v.48, p.101-115, 2009.

NORGARD, O.; KVALOY, J. T. et al. Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: The balance between accuracy and precision. **Analytical Biochemistry**. v. 356, p. 182-193, 2006.

OBA, Y.; SATO, M.; OJIKI, M. et al. Enzymatic and genetic characterization of firefly luciferase and *Drosophila* CG6178 as a fatty acyl-CoA synthetase. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 69, n. 4, p. 819-828, 2005.

OHNISHI, A.; HASHIMOTO, K.; IMAI, K. et al. Functional characterization of the *Bombyx mori* fatty acid transport protein (BmFATP) within the silkworm pheromone gland. **Journal of Biological Chemistry**. v. 284, n. 8, p. 5128-5136, 2009.

OUALI, F.; DJOUADI, F.; MERLET-BÉNICHOU, C. et al. Regulation of fatty acid transport protein and mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation gene expression by fatty acids in developing rats. **Pediatric Research**. v. 48, p. 691-696, 2000.

PETERSEN. T. N.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. et al. Signal P 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**. v. 8, p.785-786, 2011.

PONTES, E. G.; GRILLO, L. A. M.; GONDIM, K. C. Characterization of lipophorin binding to the fat body of *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, n. 11, p. 1409-1417, 2002.

PUZZI, D. **Manual de Armazenamento de Grãos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977.

QIAN, S.; FUJII, T.; ITO, K.; NAKANO, R.; ISHIKAWA, Y. Cloning and functional characterization of a fatty acid transport protein (FATP) from the pheromone gland of a lichen moth, *Eilema japonica*, which secretes an alkenyl sex pheromone. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.41, p-22-28, 2011.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia**. São Paulo: Holos editora, 810p. 2012.

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.

RICHARDS, M. R.; HARP, J. D.; ORY, D. S. et al. Fatty acid transport protein 1 and long-chain acyl coenzyme A synthetase 1 interact in adipocytes. **Journal of lipid research**. v. 47, p.665-672, 2006.

RICHIERI, G. V.; KLEINFELD, A. M. Unbound free fatty acid levels in human serum. **Journal of Lipid Research**. v. 36, p. 229–240, 1995.

RYAN, R. O.; VAN DER HORST, D. J. Lipid transport biochemistry and its role in energy production. **Annual Review of Entomology**. v.45, p.233-260, 2000.

RYAN, R. O.; WELLS, M. A.; LAW, J. H. Lipid transfer protein from *Manduca sexta* hemolymph. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v.136, p.260–265, 1986.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. J. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers**. In: KRAWETZ, S. e MISENER, S. (Ed.). Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Totowa: Humana Press, 2000. p.365-386.

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.

SANDERS, H. R.; EVANS, A. M. et al. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, n. 11, p. 1105-1122, 2003.

SANTOS, R.; ROSAS-OLIVEIRA, R.; SARAIVA, F. B. et al. Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 77, n. 1, p. 1-16, 2011.

SARAIVA, F. B. **Identificação e caracterização de acetil-CoA carboxilase no inseto *Rhodnius prolixus***. 2015. 120 Dissertação (Mestrado). Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SHENG, Z.; XU, J.; BAI, H.; ZHU, F.; PALLI, S. R. Juvenile hormone regulates vitellogenin gene expression through insulin-like peptide signaling pathway in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of Biological Chemistry**. v.286, p. 41924–41936, 2011.

SMITH, A. F.; TSUCHIDA, K.; HANNEMAN, E.; SUZUKI, T. C.; WELLS, M. A. Isolation, characterization, and cDNA sequence of two fatty acid-binding proteins from the midgut of *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**. v.267, p.380–384, 1992.

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.

SRERE, P. A. Complexes of sequential metabolic enzymes. **Methods in Enzymology**. v.56, p.89–124, 1987.

STAHL, A.; HIRSCH, D.; GIMENO, R. E. et al. Identification of the Major Intestinal Fatty Acid Transport Protein. **Molecular Cell**. v.4, p. 299-308, 1999.

STAHL, A.; EVANS, J. G.; PATELL, S. et al. Insulin Causes Fatty Acid Transport Protein Translocation and Enhanced Fatty Acid Uptake in Adipocytes. **Developmental Cell**. v.2, p. 477-488, 2002.

STEINBERG, G. R.; DYCK, D. J.; CALLES-ESCANDON, J. et al. Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 8854-8860, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, M. L. F.; FRANCO, A. A. Infestação por larvas de *Cerotoma arcuata* (Olivier) (Coleoptera: Chrysomelidae) em nódulos de feijoeiro em cultivo com cobertura morta ou em consórcio com milho ou com caupi. **Ciência Rural**. V. 37, p. 1529-1535, 2007. ISSN 1678-4596.

TOUTGES, M. J.; HARTZER, K.; LORD, J.; OPPERT, B. valuation of reference genes for quantitative polymerase chain reaction across life cycle stages and tissue types of *Tribolium castaneum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58 (16), p. 8948-51, 2010.

TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*: Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. **Insect Biochemistry**. v.18, n.3, p.263-268, 1988.

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 absorpition. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P.F. (Eds.). **Biology of insect midgut**. Londres: Chapman & Hall, p.293-320, 1996.

TURUNEN, S. Metabolic pathways in the midgut epithelium of *Pieris brassicae* during carbohydrate and lipid assimilation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.23, p.681–689, 1993.

TUSNÁDY, G. E.; SIMON, I. Topology of membrane proteins. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**. v. 41, n. 2, p. 364-368, 2001.

VIANA, P. F. **Manejo de *Diabrotica speciosa* na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa, 2010. 6p. (Embrapa, Circular Técnica, 141).

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.

XIE, Y. S.; BODNARYK, R. P.; FIELDS, P. G. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. **The Canadian Entomologist**. v. 128, p. 865-875, 1996.

WATKINS, P. A.; LU, J. F.; STEINBERG, S. J. et al. Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene decreases very long-chain fatty acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. **The Journal of Biological Chemistry**. v.273, p. 18210-18219, 1998.

WEINTRAB, H; TIETZ, A. Triglyceride digestion and absorption in the locust, *Locusta migratoria*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.306, p.31-41, 1973.

WOODCOCK, T. S.; BOYLE, E. E.; ROUGHLEY, R. E.; KEVAN, P. G.; LABBEE, R. N.; SMITH, A. B. T.; GOULET, H.; STEINKE, D.; ADAMOWICZ, S. J. The diversity and biogeography of the Coleoptera of Churchill: insights from DNA barcoding. **Biomed Central Ecology**. v.13, p.1-15, 2013.

WU, Q.; ORTEGON, A. M.; TSANG, B. et al. FATP1 Is an Insulin-Sensitive Fatty Acid Transporter Involved in Diet-Induced Obesity. **Molecular and Cellular Biology**. v. 26, p. 3455-3467, 2006.

YIN, A.; PAN, L.; ZHANG, X.; WANG, L.; YIN, Y.; JIA, S.; LIU, W.; XIN, C.; LIU, K.; YU, X.; SUN, G.; AL-HUDAIB, K.; HU, S.; AL-MSSALLEM, I. S.; YU, J. A transcriptomic study of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* embryogenesis. **Insect Science**. 43p, 2013a.

YU, N.; BENZI, V.; ZOTTI, M. J.; STALJANSSENS, D.; KACZMAREK, K.; ZABROCKI, J. et al. Analogs of sulfakinin-related peptides demonstrate reduction in food intake in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, while putative antagonists increase consumption. **Peptides**. v. 41, p.107–112, 2013b.

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.

ZHAN, T.; POPPELREUTHER, M.; EHEHALT, R.; FULLEKRUG, J. Overexpressed FATP1, ACSVL4/FATP4 and ACSL1 increase the cellular fatty acid uptake of 3T3-L1 adipocytes but are localized on intracellular membranes. **PLoS ONE** 7:e4508, 2012.

ZIEGLER, R. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. **Journal of Comparative Physiology B**. v.161, p.125–131, 1991.

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.36, p.264–272, 2006.

ANEXO A - Produção não-referente à tese submetida à revista *Bioorganic Chemistry*

Evaluation of guanylhyazone derivatives as lipase inhibitors from *Candida rugosa*: biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application

Camilla C. Santana^a, Edeildo F. Silva-Júnior^{a,b}, João César N. Santos^b, Érica E. da S. Rodrigues^a, Isabela M. da Silva^b, João X. Araújo-Júnior^{a,b}, Ticiano G. do Nascimento^a, Leandro A. Oliveira Barbosa^c, Camila B. Dornelas^a, Isis M. Figueiredo^b, Josué Carinhanha C. Santos^{b,*} and Luciano Aparecido M. Grillo^{a,*}

^a *Nursing and Pharmacy School, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.*

^b *Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil.*

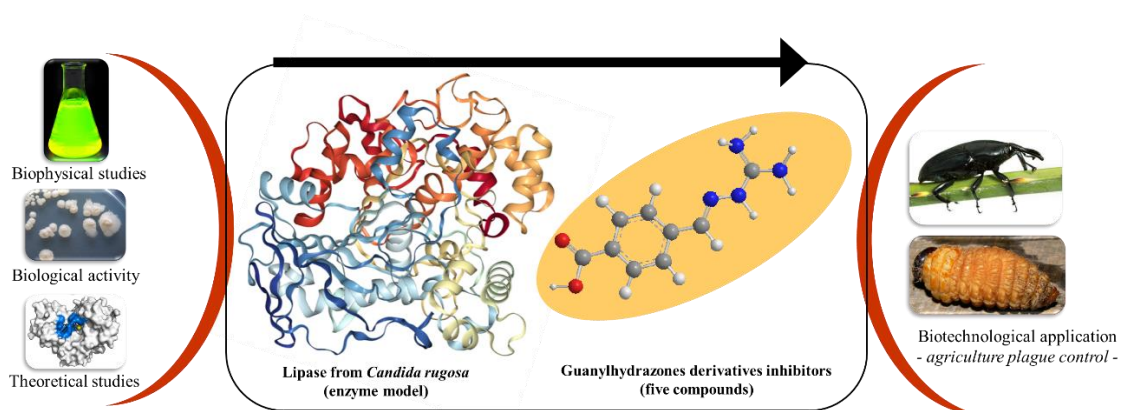
^c *Laboratory of Cell Biochemistry, Federal University of São João del Rei, Dona Lindú Centro-Oeste Campus, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.*

***Corresponding authors:**

✉ E-mail address (JCCS): josue@iqb.ufal.br / Phone: +55 82 3214-1347

✉ E-mail address (LAMG): luciano.grillo@esenfar.ufal.br / Phone: +55 82 3214-1154

Graphical abstract



Highlights

- Five guanyldihydrazone derivatives were evaluated as lipase inhibitors *in vitro*
- The derivative **LQM11** was the more active with IC_{50} of $14.70 \pm 0.61 \mu M$
- **LQM11** leads to structural changes in lipase through electrostatic interactions
- **LMQ11** is a non-competitive inhibitor by spectroscopic and theoretical studies
- **LQM11** can be promisor compound to the control of *Rhynchophorus palmarum*

Abstract

This work aimed to evaluate the inhibition of *Candida rugosa* lipase by five guanyldihydrazones derivatives through biological, biophysical and theoretical studies simulating physiologic conditions. The compounds most and least active against the enzyme inhibition were **LQM11** ($IC_{50} = 14.70 \mu M$) and **LQM16** ($IC_{50} = 171.8 \mu M$), respectively, therefore, for a better understanding of the interaction process spectroscopic and theoretical studies was performed. In fluorescence assays, **LQM11** and **LQM16** interact with *Candida rugosa* lipase by a static quenching mechanism with non-fluorescent supramolecular complex formation changing the native protein structure. The binding constant ranged from $4.48 \times 10^5 M^{-1}$ (**LQM11**) to $0.41 \times 10^5 M^{-1}$ (**LQM16**) at $38^\circ C$, in agreement with the results of lipase inhibition. The binding process was spontaneous ($\Delta G < 0$) and electrostatic forces ($\Delta H < 0$ and $\Delta S > 0$) played a preferential role in stabilizing the complex. The compounds were classified as non-competitive inhibitors using Orlistat as a reference in competition studies. Based on the 1H NMR assays it was possible to propose the epitopes of **LQM11** and **LQM16**. Theoretical studies were consistent with the experimental results. Finally, the guanyldihydrazones derivatives were assessed in the inhibition of lipase from crude intestinal extract of larvae of *Rhynchophorus palmarum*, an important agricultural plague.

Keywords: *Candida rugosa* lipase; guanyldihydrazones derivatives; lipase inhibitors.

1. Introduction

Guanyldihydrazone derivatives represent a class of compounds showing critical pharmacological properties. The aminoguanidine presents a versatile moiety with hydrogen bond acceptor and donor properties as well as being able to establish electrostatic interactions [1-5]. Noteworthy, there are many compounds content the hydrazone moiety in their structures whose present a sizeable biological profile, which, for example, favors the use of these upon adipose-triglyceride lipases (ATGL), avoiding the increase of the plasma fatty acid (FA) levels [6].

In the last decades, several pieces of evidence have suggested that FA metabolism is closely related to the development of metabolic disorders. The increase of FA in the circulations, as verified in obesity, should be caused by FA overload of non-adipose tissues, resulting in triglyceride (TG) accumulation, which is related to impaired metabolic functions of these tissues, insulin resistance, and inflammation [7,8]. In general, plasma FA levels will determine by lipases catalyzing the degradation of TG stores in adipose tissue. Based on this, the decreasing of these levels is an exciting strategy to counteract the development of metabolic disease.

The *Candida rugosa* lipase (CRL) is an enzyme that consists of 535 amino acids in an alpha-beta hydrolase fold. Features of this protein include a hydrophobic core, a variety of β -sheet and helix secondary structure, and a lid formed by an amphipathic α -helix which covers the active site when closed and can spontaneously open to expose the active catalytic triad (Ser209-Glu341-His449) to the solvent [9, 10]. However, the lid-opening event is thought to occur in the presence of phase boundaries and hydrophobic environments [6]. Moreover, there is an oxyanion formed by Gly124 and Ala210. The formation of the oxyanion hole does not depend on the repositioning of amino acid residues following the opening of the lid [9]. The mechanism of the hydrolysis consists of several steps and remains will be fully elucidated, but

a suggested pathway has been extrapolating from that proposed for serine proteases; where the final step involves the release of a carboxylic acid [11-14]. In this context, CRL is an essential industrial enzyme, which is employing in biotechnological applications such as the production of FA and the synthesis of several esters [15,16]. Furthermore, it is applying as a biocatalyst to pharmaceuticals, cosmetics, textiles, and food industries [17,18]. Therefore, this enzyme was selected as the model for the inhibition studies.

This work aimed to evaluate the inhibition of CRL activity by guanylhyazone derivatives through biological, biophysical and theoretical studies. The guanylhyazone derivatives performed CRL activity inhibition assays, and the best and worst inhibitors were then select for comparative analysis. Spectroscopic studies and a computer model was used to predict the behavior and types of interactions, using molecular dynamics and docking, and evidencing the properties of the interfacial activation, concerning the lipolytic activity decreases. Additionally, the Density Functional Theory (DFT) was employed as a method to described strong Gibbs free energy values for each complex formation. Finally, due to *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) feed on the plant species of 12 different families and have been reported as one of the most important pests on commercial palm plantations [19, 20], lipase inhibition assays on the crude extract of the intestine of *Rhynchophorus palmarum* larvae were performed aiming a new possibility for biotechnological application.

2. Experimental

2.1 Reagents and solutions

The enzyme used in the inhibition assays and interaction studies was a commercial lipase from *Candida rugosa* type VII (1135 units mg⁻¹), 2,3-dimercapto-1-propanol tributyrat, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), Triton X-100, Tris-HCl, orlistat, 8-

anilidonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS), deuterium oxide (D₂O) and 4-methyl-umbelliferyl butyrate were obtained from Sigma-Aldrich® (St. Louis, EUA). Other reagents employed in the assays were of analytical grade with purity above 98%. Stock and work solutions of guanyldrazones derivatives and CRL were prepared in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0 ± 0.1). Ultrapure water (18.2 MΩ cm⁻¹) was used in all the experiments to prepare the solutions (Millipore, USA). The variations in the concentrations of enzyme and guanyldrazones derivatives employed in the different experiments are related to the sensitivity and specificities of each technique or method applied.

2.2 Guanyldrazone derivatives

The guanyldrazone derivatives (LQM, Fig. 1) were prepared by the reaction of an aryl aldehyde with aminoguanidine hydrochloride (1:1.25 eq.). The compounds evaluated in this work as CRL inhibitors were previously described and characterized by França et al. [21].

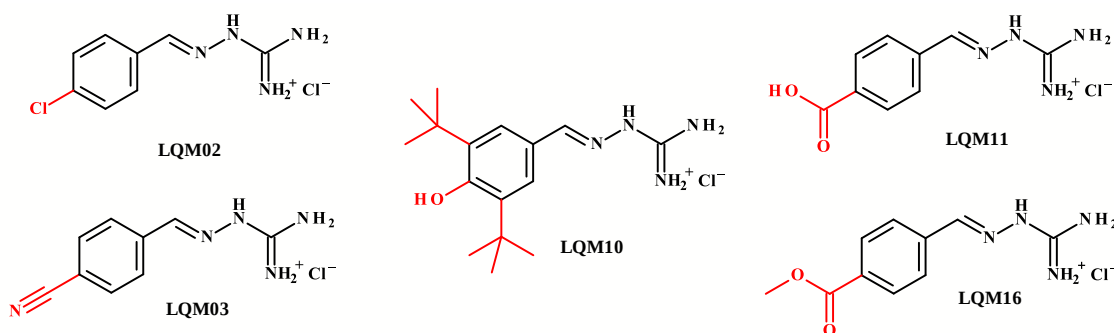


Fig. 1. Chemical structure of **LQM** guanyldrazone derivatives evaluated as CRL inhibitor.

2.3 Lipase inhibitory activity assay *in vitro*

Lipase activity screening was assayed as described by Choi et al. [22]. A standard mixture was prepared using 10 mM of 2,3-dimercapto-1-propanol tributyrates (DMPTB), 40 mM of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.5 M EDTA, 10% (m/v) of Triton X-100 and 1.0 M of Tris-HCl (pH 8.0 ± 0.1), 2 U of the enzyme (1.8 μL of 1 mg mL⁻¹ solution) and incubated at 37°C. A control in the absence of DMPTB was employed.

Inhibition of CRL activity by guanyldihydrazone derivatives (200 μM) was evaluated by pre-incubation (10 min) at different concentrations. After this, the absorbance at 405 nm was measured. CRL and crude extract from the anterior and posterior gut of *Rhynchophorus palmarum* larvae were used as the source of enzymes for the inhibition assays. The assays for inhibition concentration (IC_{50}) calculations were performed using the fluorogenic substrate 4-methyl-umbelliferyl (MUF) butyrate based on Diaz et al. [23]. The IC_{50} value has been shown employing the statistical method of the sigmoidal dose-response curve.

2.4 Biotechnological application: insects and enzyme sources

The larvae (third instar) of *Rhynchophorus palmarum* employed in this study were fed exclusively on live vegetative tissue and taken from a colony maintained at 28°C with 80% relative humidity. The foregut and hindgut were dissected from the *Rhynchophorus palmarum* larvae. The luminal content was removed, and the tissues were homogenized in a cold buffer (20 mM Tris-HCl at pH 8.0 and containing 0.25 M sucrose) and were used as enzyme sources [19]. The protein concentrations were determined as described by Bradford using bovine serum albumin as a standard [24].

2.5 Biophysical studies exploring spectroscopic techniques

The molecular fluorescence spectra in the steady-state mode were obtained using a spectrofluorophotometer model RF-5301PC (Shimadzu, Japan) with a xenon lamp (150 W) as the radiation source. The measurements were made in a quartz cuvette with an optical path of 1.0 cm. The excitation and emission slits were 5 and 10 nm, respectively. In the spectrofluorometric titrations of the enzyme ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/343 \text{ nm}$), increasing increments of guanyldihydrazone derivatives **LQM11** or **LQM16** (0 - 100 μM) was added in CRL solution (0.1 mg mL^{-1}) at different temperatures (22, 30 and 38°C).

For the 3D-fluorescence experiments, CRL solutions (0.1 mg mL^{-1}) in the absence and presence of **LQM11** or **LQM16** ($60 \text{ }\mu\text{M}$) were excited in the 220-350 nm range with emission spectra recorded from 250 to 650 nm. Synchronous fluorescence studies were applied to monitor the tryptophan ($\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$) and tyrosine ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$) residues separately, as well as the evaluation of the microenvironment polarity of these amino acids in the enzyme [25]. Finally, orlistat (10 and $30 \text{ }\mu\text{M}$) was used as a competitive lipase inhibitor in the competition assay with guanylhyazone derivatives by the active site of the enzyme.

The UV-vis experiments were performed employing spectrophotometer AXJ-6100PC (Micronal, Brazil) of double beam equipped with a quartz cuvettes pair having 1.0 cm of the optical path. The spectra of CRL (0.2 mg mL^{-1}), guanylhyazone derivatives ($10 \text{ }\mu\text{M}$) and the respective mixture (CRL + **LQM11** or **LQM16**) were obtained in the absorbance module at 30°C .

The interaction between CRL with the and guanylhyazone derivatives by ^1H NMR was evaluated based on **LQM11** or **LQM16** (1 mM) spectra profile in the absence and presence of 0.4 mg mL^{-1} of the enzyme. The spectra were obtained on a Bruker 400 MHz spectrometer ($B_0 = 9.4 \text{ T}$), using an indirect detection probe of 5 nm at 22°C . The solutions were prepared in 10 mM phosphate buffer (pH 8.0) using $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (1:10) containing $40 \text{ }\mu\text{M}$ sodium trimethylsilyl propionate (TMSP) at final concentration [26,27]. In the experiments containing the mixture CRL and guanylhyazone derivatives the resolution, peaks multiplicity, and variation of the chemical shift (δ) were used as an evaluation parameter.

2.6 Theoretical studies of CRL with guanylhyazone derivatives (**LQM11** and **LQM16**)

2.6.1 Molecular dynamics simulations

The X-ray crystal structure ($2.1 \text{ }\text{\AA}$ resolution) of the Lipase from *Candida rugosa* (PDB entry: 1TRH) was selected for carrying out the molecular dynamics (MD) simulations.

All hydrogen atoms were added using the AutoDock Tools[®] version 1.5.4 (<http://mgltools.scripps.edu/downloads/previous-releases/mgltools-1-5.4/mgltools-1-5.4>) [28]. Moreover, the pK_a values of the macromolecule were estimated applying the empirical PROPKA[®] version 3.1 at pH 7.4 (physiological conditions) [29-31]. Gromacs[®] 2016 software (<http://www.gromacs.org/>) was used to perform the MD simulations. In total, fourteen sodium counterions (Na⁺) were added into the system to obtain electroneutrality, and the full system was placed in an orthorhombic box of water molecules (1000 Å³). The CRL structure and water molecules were minimized by OPLS force field, implemented in the Gromacs[®] 2016 program. In a sense, the Simple Point Charge (SPC) 2016 model was used to describe the water solvation model [13]. The complete system was described as a total of 46210 atoms, and it was relaxed for 20 ns at 300 K. Finally, to validate the CRL structure generated by MD the Ramachandran plots were obtained using Rampage[®] server (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) developed by Crystallography and Bioinformatics Group from the University of Cambridge [32].

2.6.2 Docking molecular

In the studies, by docking molecular, the ligand structures were drawn in .smiles* format, and they were converted into three-dimensional .mol2* files using Corina[®] (Molecular Networks, <http://www.molecular-networks.com/>) [33]. Austin Model (AM1) was employed as a method for energy minimization by ArgusLab[®] version 4.0.1 (<http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>). All final structures were converted in .pdbqt* files by AutoDock Tools[®] version 1.5.6. The ligand structures were considered into pH 7.4 (at physiological conditions). Finally, the protonation states were generated using the Fixpka from QUACPAC[®] version 15.0 program (<http://www.eyesopen.com/news/quacpac-v150-released>). Furthermore, ions and water molecules from the more stable CRL generated

by MD simulations were removed, using the graphical interface of AutoDock Tools v. 1.5.6 [33]. Based on the possibility that there is an allosteric binding site, the blind-docking method was employed as a more convenient docking protocol. In sense, a grid box centered on x: -0.06; y: 0.096; and z: 0.289 Å was applied. This grid was used to evaluate the steric boundary of the CRL and van der Waals and/or hydrogen bond interactions between the ligands and the binding site [34]. Partial atomic charges were added by using the Kollman mathematical method, and all atoms were assigned as AD4 type. Finally, the molecule was converted to .pdbqt* extension [35,36].

2.6.3 Gibbs free energies of binding (ΔG) determination by density functional theory

Recently, several studies using broadly employed docking programs concluded that no docking program is capable of predicting accurate Gibbs free energy of binding (ΔG) [37-40]. On the other hand, the ΔG between a ligand and macromolecular target can be accurately obtained from the application of rigorous chemical calculations, based on quantum chemistry [41,42]. The Density Functional Theory (DFT) calculations were performed using the M06/6-31G(d) level of theory from the Spartan[®] version 14.0 program. This level of theory was applied to provide the corrected values of ΔG from the ligands-CRL complex formation. The M06 method applies the global hybrid functional, which is the top performer within the six functionals of the leading group, thermochemistry, kinetics and non-covalent interactions [43-45]. In a sense, the correct structures of the ligands and their active sites into CRL structure were required, whose they were extracted from the molecular docking studies. The binding energy values were obtained applying the equation 1, where the ΔG was calculated as the difference between the complex energy (E_{complex}) and the sum of the CRL enzyme (E_{enzyme}) and ligand (E_{ligand}) energies considered separately:

$$\Delta G = [E_{\text{complex}} - (E_{\text{enzyme}} + E_{\text{ligand}})] \quad \text{equation (1)}$$

In these calculations, the electrostatic and steric effects of the protein environment surrounding the active site were ignored entirely. Finally, all these procedures were performed as described by Silva-Júnior et al. [42].

3. Results and discussion

3.1 Biological studies: inhibition of the lipase activity and IC_{50} determination in vitro

The inhibition assays using a commercial *C. rugosa* lipase (CRL) showed that significant inhibition only with the guanyldrazone derivatives **LQM02** and **LQM11**, with lipase activity reduction of 23 and 47%, respectively (Fig. 2A).

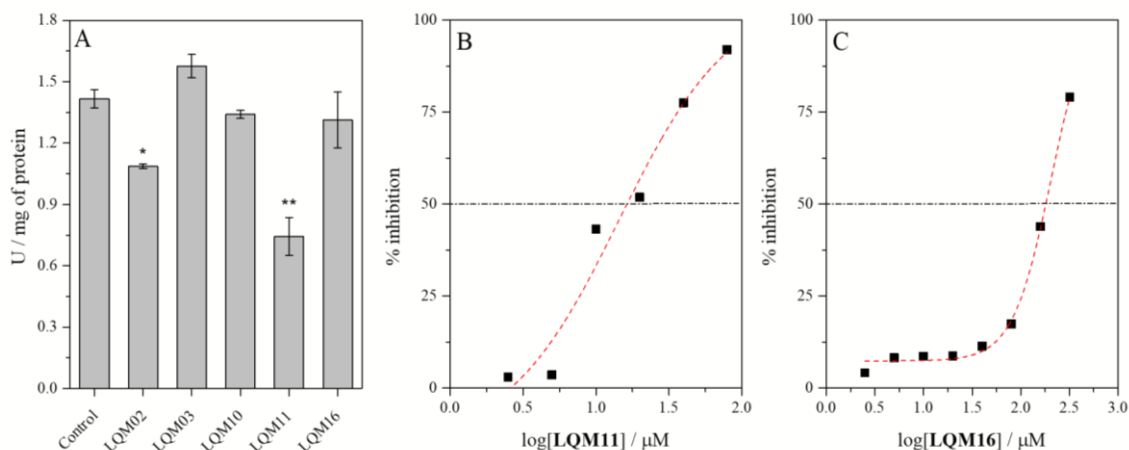


Fig. 2. (A) Effect of guanyldrazone derivatives on the activity of CRL. For the screening assay, enzyme activity was assessed containing 200 μ M of guanyldrazone derivatives at pH 8.0. (B) **LQM11** and (C) **LQM16** dose-response curve profile for inhibition concentration (IC_{50}) determination. The error bars represent the SD for the three determinations (* $p < 0.05$).

To evaluate the inhibition profile and predict the possible interactions between guanyldrazone derivatives and enzyme **LQM11** and **LQM16** compounds were selected (best and worst inhibitor, respectively) to proceed in more specific interaction studies. Considering that the carboxylic acid in **LQM11** in the pH 8.0 will be dissociated entirely, the main difference between the selected compounds is a methyl group, which leads to drastic changes in the activity of guanyldrazone derivative **LQM11** about **LQM16**. The small structural variation in the compounds carried out selectivity inhibition in the CRL activity (Fig. 2A), this behavior is supported by Barreiro et al. [46], which presented several examples

of the methylation effect on physical, chemical and biological properties. Therefore, the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated for both guanyldihydrazone derivatives. The best inhibitor (**LQM 11**) showed IC_{50} of $14.70 \pm 0.61 \mu M$ (Fig. 2B), while the worst inhibitor (**LQM16**), showed IC_{50} values around $171.8 \pm 1.6 \mu M$ (Fig. 2C), consequently, the **LQM11** derivative was approximately 12 times more active than their analogous.

Finally, the guanyldihydrazone derivative **LQM11** presents IC_{50} value comparable to other lipase inhibitors (*in vitro* assays) reported in the literature for synthetic and natural compounds against different enzymes models (Table S1, supplementary material). Surprisingly, the compound **LQM11** was more active against the CRL when compared to the orlistat ($IC_{50} = 137.2 \mu M$ at pH 7) [47].

3.2 Evaluation of interaction process by biophysical studies

The biophysical studies based on different spectroscopic techniques were applied to obtain a mutual understanding of enzymatic inhibition process of CRL by guanyldihydrazone derivatives **LQM11** and **LQM16**.

3.2.1 Binding and thermodynamics parameters exploring fluorescence spectroscopy

Proteins there is often three intrinsic fluorophores tryptophan (Trp), tyrosine (Tyr), and phenylalanine (Phe) residues. The Phe residue has low fluorescence quantum yield, while Tyr residue fluorescence is almost entirely quenched by the carboxyl group, disulfide bonds or Trp residue. Lipase from *C. rugosa* contains five Trp residues at locations 119, 161, 188, 221 and 489 and twenty Tyr residues [48]. The CRL intrinsic fluorescence is contributed mainly by Trp residues, which can be used as intrinsic fluorophores to provide information on the enzyme-ligand interaction and ligand-induced conformational change around the binding

site [26]. Thus, the binding and thermodynamic parameters of guanylhyazone derivatives **LQM11** and **LQM16** (best and worst enzyme inhibitor, respectively) with CRL exploring fluorescence spectroscopy was established.

To evaluate the interaction among guanylhyazones derivatives (**LQM11** and **LQM16**) and CRL was explored by spectrofluorometric titration based on protein intrinsic fluorescence. The fluorescence spectra profile of CRL titrated with the ligand **LQM11** is shown in Fig. 3A. A similar spectral profile as obtained to CRL and **LQM16**.

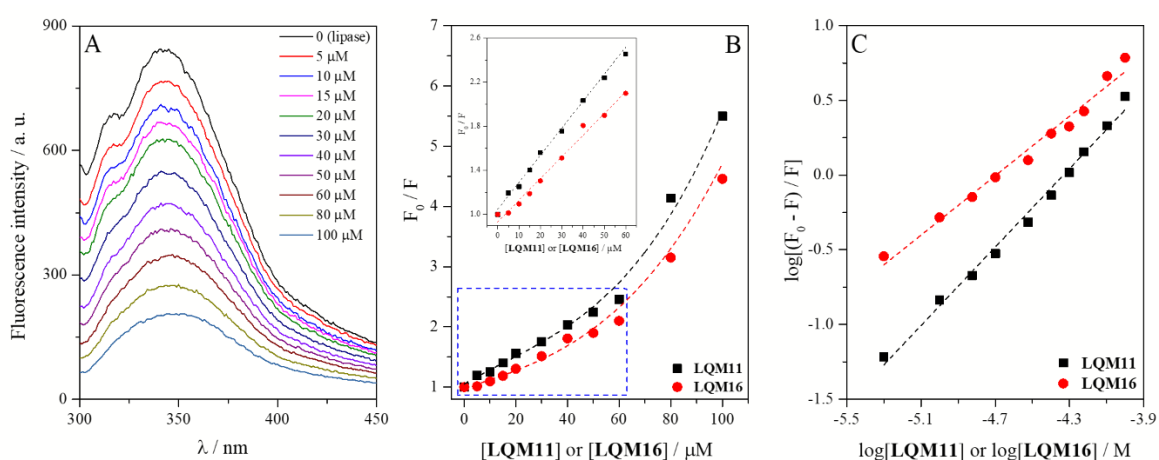


Fig. 3. (A) Lipase from *Candida rugosa* (0.1 mg mL⁻¹) emission spectral profile at different concentrations of **LQM11** from 0 to 100 μM in pH 8.0 and 30°C. (B) Stern-Volmer quenching plot. The inset in (B) corresponds to a linear range in the Stern-Volmer plot. (C) Double logarithmic curve to the binding constant calculation.

The CRL presented an intense and broad band, centered at 343 nm when excited at 280 nm and the ligands addition carried out the decrease in fluorescence intensity, besides emission band shift from 343 to 345 nm. The redshift caused by ligands interaction with CRL lead to exposure of the Trp to a more polar microenvironment, indicating a change in the conformational of the native enzyme [49]. Thus, to examine the mechanism of interaction between **LQM11** and **LQM16** with CRL was applied the Stern-Volmer equation:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad \text{or} \quad \frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{equation (2)}$$

F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and the presence of the ligand, respectively; K_q is the bimolecular diffusion quenching rate constant, τ_0 is the average lifetime

(10^{-8} s), [Q] is the ligand concentration (quencher), and K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant [27]. The binding constant was calculated according to equation 3:

$$\log \left[\frac{(F_0 - F)}{F} \right] = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{equation (3)}$$

K_b is the binding constant and n is the number of binding sites. The Fig. 3B-C shows linearization of the equations (2) and (3), respectively, to calculate the binding parameters (K_{SV} , K_b , and n). The temperature effect on the interaction process between guanylhyazones derivatives (**LQM11** and **LQM16**) and CRL was further investigated and the results summarized in Table 1.

The exponential profile of K_{SV} plot (Fig. 3B) indicates that all Trp residues are accessible to the quencher or, only one of Trp residues is responsible for fluorescence emission [50]. The concentration liner range obtained employing guanylhyazone derivatives from 5.0 to 60 μM was employed to calculate K_{SV} values (Table 1) and determine the quenching mechanism. The K_{SV} values decreased upon an increment of temperature from 22 to 38°C, indicating the unusual occurrence of static quenching, due to higher temperatures affect the enzyme-ligand complex stability [51]. In contrast, the increment in K_{SV} values associated with the increase in temperature would lead to typical dynamic quenching due to larger diffusion coefficient values. According to Das et al. [52], when the K_q is less than $2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ occurs a dynamic quenching, while higher K_q values are an indication of static quenching mechanism. The K_q values obtained in this study (Table 1) varied from 1.87 to $2.55 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, confirming that the interaction process occurs through the static quenching.

The ligand affinity with CRL is a relevant parameter for the enzyme-ligand interaction study and thereby helps to explain the lipase inhibition profile. The K_b values for the guanylhyazone derivatives and CRL complexes interaction ranged from 4.48 to 5.17×10^5

M^{-1} for **LQM11** and 0.41 to $0.54 \times 10^5 M^{-1}$ for **LQM16** based on temperature variation ([Table 1](#)), and the n was close to unity indicating that there is a single site of binding of the ligands with the enzyme. Therefore, the compound **LQM11** presented more affinity towards CRL, since the K_b values were ~11-fold greater than that of **LQM16** (at $38^\circ C$), corroborating with biological activity assay, being obtained an IC_{50} value for **LQM11** ~12-fold greater than that of **LQM16**.

Table 1Binding and thermodynamic parameters of the interaction process of **LQM11** and **LQM16** with CRL.

Compound	T (°C)	Quenching parameters			Binding parameters			Thermodynamic parameters		
		K_{SV} (10^4 M^{-1})	r^*	K_q ($10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K_b (10^5 M^{-1})	n	r^*	ΔH (kJ mol^{-1})	ΔS ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	ΔG (kJ mol^{-1})
LQM11	22	2.55 ± 0.08	0.9976	2.55	5.17 ± 0.24	1.27 ± 0.07	0.9942			- 28.84
	30	2.46 ± 0.09	0.9963	2.46	4.92 ± 0.19	1.29 ± 0.04	0.9972	- 29.67	+ 2.93	- 28.81
	38	2.38 ± 0.01	0.9959	2.38	4.48 ± 0.11	1.17 ± 0.06	0.9964			- 28.79
LQM16	22	2.05 ± 0.05	0.9974	2.05	0.54 ± 0.03	1.09 ± 0.05	0.9962			-5.83
	30	1.98 ± 0.03	0.9992	1.98	0.47 ± 0.01	1.05 ± 0.03	0.9951	- 13.46	+ 25.86	-5.62
	38	1.87 ± 0.02	0.9978	1.87	0.41 ± 0.02	1.07 ± 0.04	0.9948			-5.42

* r represents the linear correlation coefficient (Pearson coefficient)

Binding sites number (n) were calculated and varying for evaluated compounds from 1.05 to 1.27, indicating the interactions among these ligands and enzyme occur in the ratio 1:1. Additionally, the guanylylhydrazone derivatives assessed shown binding constant values comparable to other compounds interacting with different lipases models (Table S2).

The thermodynamic parameters (ΔH and ΔS) were calculated according to the linearization of the Van't Hoff equation (Fig. S1, supplementary material) whereas the heat of reaction does not change with temperature [53]:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{equation (4)}$$

T is the temperature in Kelvin (K), and R is the universal gas constant. The Gibbs free energy (ΔG) value was obtained using the following equation:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{equation (5)}$$

The calculated thermodynamic parameters are presented in Table 1. According to Ross and Subramanian [54], when $\Delta H < 0$ and $\Delta S > 0$ the interaction between **LQM11** and **LQM16** with CRL is preferably governed by electrostatic forces. This fact can be justified by the chemical structure of the compounds, where protonation of the positively charged amine groups (in both compounds) and dissociation of the carboxylic acid group with a negative charge (in **LQM11**) is expected. Besides, was evident that the interaction of **LQM11** was more associated with enthalpic factors, whereas of **LQM16** about entropic factors. Finally, all values of ΔG were negative indicating the spontaneity of the interaction.

3.2.2. UV-vis evaluation of interaction process

The UV-vis spectroscopy was used to assess the formation of the guanylylhydrazone derivatives and CRL complexes based on monitoring of the structural changes in the protein, besides confirming the quenching mechanism related with the fluorescence suppression process [55].

The free CRL presented maximum absorption at 277 nm associated aromatic residues of Trp, Tyr and Phe absorption due to the transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ [50], while the $\lambda_{\max}$ for **LQM11** and **LQM16** were 313 and 317 nm, respectively, because the transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ and $n \rightarrow \pi^*$ (Fig. S2). Once **LQM11** was added to the CRL solution, verified a hyperchromic effect followed by a 29 nm bathochromic shift, indicating an interaction between enzyme and ligand with the supramolecular complex formation. The spectrum acquired from subtraction of the complex spectra by the free ligand (**LQM11**) resulted in a non-overlapping spectrum to the free CRL spectrum (Fig. S2A), proving that there was no additive effect of Beer's law (Table S3) and confirming the enzyme and **LQM11** complex formation. Similar results were obtained for guanyldiazide derivative **LQM16**.

Since that supramolecular complex formation shown by UV-vis is related with changes in the ground state of evaluated compounds (**LQM11** and **LQM16**) and CRL in the interaction process [51,52], the static quenching mechanism previously reported by molecular fluorescence results is confirmed.

3.2.3. Evaluation of conformational changes in the structure of CRL

3.2.3.1. Three-dimensional fluorescence spectroscopy

The three-dimensional (3D) fluorescence spectroscopy to allows a study of the conformational changes in the secondary structure of the proteins [25-27]. The 3D fluorescence spectra for CRL and several complexes with **LQM11** and **LQM16** are presented in

Fig.

4.

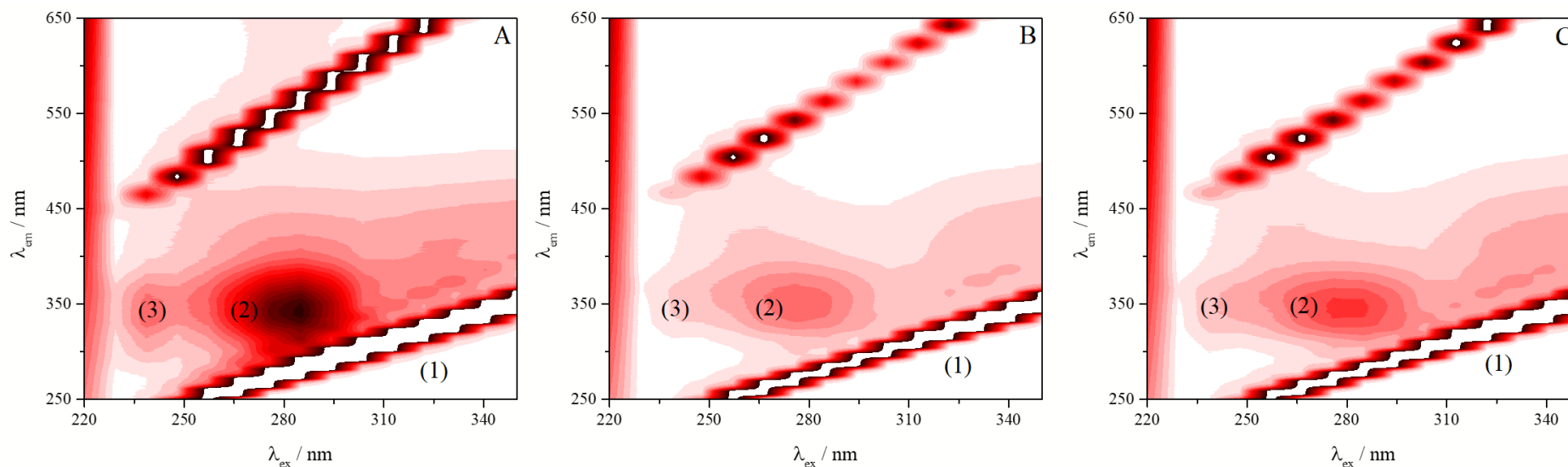


Fig. 4. Tridimensional fluorescence spectra of (A) CRL (B) CRL-**LQM11** and (C) CRL-**LQM16** complex. Enzyme and ligands at 0.1 mg mL^{-1} and $60 \text{ }\mu\text{M}$, respectively, all systems at pH 8.0 and 30°C .

Table 2

Three-dimensional fluorescence spectrum parameters for the CRL and the complexes with **LQM11** and **LQM16**. Conditions: pH of 8.0 at 30°C .

Peak	CRL			CRL + LQM11			CRL + LQM16		
	Position ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$) ^a	Stokes shift $\Delta\lambda \text{ (nm)}$ ^b	Fluorescence intensity	Position ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$) ^a	Stokes shift $\Delta\lambda \text{ (nm)}$ ^b	Fluorescence intensity	Position ($\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$) ^a	Stokes shift $\Delta\lambda \text{ (nm)}$ ^b	Fluorescence intensity
(1) Rayleigh scattering	$\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$	0	>1015	$\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$	0	>1015	$\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$	0	>1015
(2) Trp and Tyr	285 / 342	55	878 (100%)	276 / 350	74	292 (33%)	276 / 346	70	361 (41%)
(3) Polypeptide chain	238 / 339	101	295 (100%)	238 / 355	117	107 (36%)	248 / 352	104	173 (59%)

^a values in nm // ^b $\Delta\lambda = \lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}}$

The 3D fluorescence spectrum of free CRL (Fig. 4A) and the complexes of **LQM11** and **LMQ16** with the enzyme (Fig. 4B-C) presented three peaks (1, 2 and 3). The peak 1 corresponds to Rayleigh scattering, which is characterized by radiation re-emission ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$) by solvent (water) of the medium; thereby a small fraction of the absorbed radiation is scattered in all directions at the same wavelength. The peak 2 is related to the emission of Trp and Tyr residues, and peak three the emission of the polypeptide backbone of the CRL [56]. After guanyldrazones derivatives addition, the fluorescence intensity of the peaks 2 and three was reduced 67 and 64% for **LQM11** and 59 and 41% for **LQM16**, respectively (Table 2).

The reduction in the fluorescence signal of the peak 2 indicates changing in the Trp and Tyr microenvironment, while for peak 3, modification in the native protein structure. The most significant variations were verified for the CRL-**LQM11** complex, thus, alterations in polypeptide protein chain, amino acids microenvironment and the original enzyme folding, resulting in the efficient lipase activity inhibition for this compound. Additionally, the change in the λ_{ex} or λ_{em} related to the fluorescence peaks (2 and 3) indicates that the native protein structure was altered. Similarly, was verified by Stokes shift in each system in comparison with free CRL that **LQM11** presented the highest variation, corroborating the previous results.

3.2.3.2. Synchronous fluorescence

Based on synchronous fluorescence measures, it is possible to monitor the interaction process and changes in the microenvironment polarity of the Trp and Tyr residues, separately [57]. In this work, Stern-Volmer constant (K_{SV}) based on $\Delta\lambda = 15$ nm (Tyr) and $\Delta\lambda = 60$ nm (Trp) was the analytical parameter used to the evaluated interaction between guanyldrazones derivatives and CRL. Synchronous fluorescence spectra profile for CRL

and **LQM11** system at pH 8.0 are shown in Fig. 5, similar results were obtained for **LQM16**. The Table S4 presented binding parameters obtained for guanyldhydrazones derivatives evaluated with CRL.

Considering the results obtained there was an emission maximum shift for both compounds evaluated against the enzyme (Fig. 5 and Table S4). For the **LQM11** and **LQM16** the shifts were more pronounced for Tyr residues than Trp, probably is due to these residues, in the CRL structure, are more accessible to ligands in comparison to Trp. The real variation indicates there was an increase in polarity of the microenvironment, as well as negative variation is related to polarity reduction, both processes allow describing changes in the original protein structure [58].

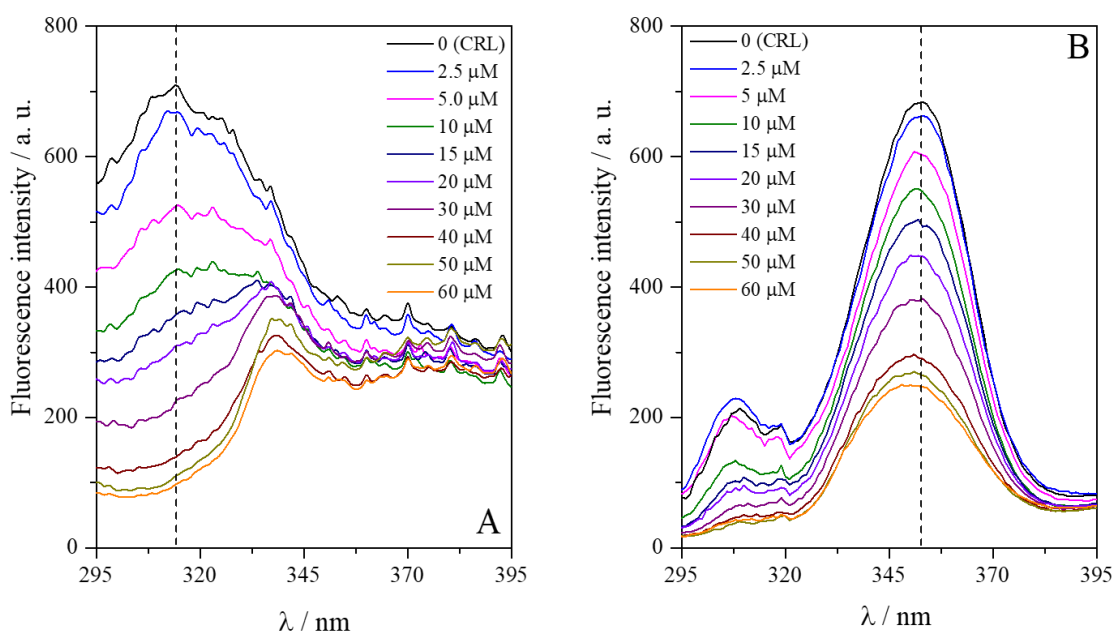


Fig. 5. Lipase from *Candida rugosa* (0.1 mg mL^{-1}) synchronous fluorescence spectra upon addition of increasing concentrations of **LQM11** at different concentrations in pH 8.0 and 30°C , monitoring (A) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ (Tyr) and (B) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ (Trp).

According to the K_{SV} values Tyr residues of CRL were systematically most affected when compared to Trp (Table S4) and had their microenvironment changed more significantly than Trp, in the interaction process. The results obtained by synchronous

fluorescence were in good agreement with those achieved by molecular docking (presented at the theoretical studies session).

3.2.4. Protein binding site evaluation

For evaluation of the preferential binding sites between the guanyldihydrazone derivatives and the CRL, were used compounds with selectivity by some areas of the enzyme, thus acting as labeling probes.

Orlistat is a compound that binds to the catalytic site of lipase being a competitive inhibitor [59]. To evaluate the site interaction in the CRL with guanyldihydrazone derivatives (**LQM11** and **LQM16**) spectrofluorometric titration based on intrinsic protein fluorescence was performed in the presence and absence of the competitor (orlistat). The ratio between binding constants was used as the evaluation parameter, where K_b' is the constant in the presence of the orlistat (at two different levels of concentration), and K_b in the absence of competitor. When the ratio $K_b' / K_b > 1$ indicate that complex between the evaluated guanyldihydrazones and CRL is favored. On the other hand, for ratio $K_b' / K_b < 1$ occurs hindrance toward supramolecular complex formation due to competition among the **LQM11** or **LQM16** and orlistat, probably, by the same region, in this case, the catalytic site of the lipase.

The results showed that orlistat did not displace of **LQM11** or **LQM16** from the lipase binding site (Table 3), consequently, the guanyldihydrazone derivatives and orlistat bind in different regions of the enzyme ($K_b' / K_b \approx 1$). Therefore, the central mechanism of action of the **LQM11** and **LQM16** is based on non-competitive inhibition, binding at an allosteric site of the CRL. The competitive assay with orlistat presented a good agreement with molecular docking results (presented at the theoretical studies session).

Table 3

CRL binding constants ratio of guanyldiazones derivatives in the presence (K_b') and absence (K_b) of orlistat, a competitive lipase inhibitor. Conditions: pH of 8.0 at 30°C.

Orlistat (μ M)	Binding constant ratio (K_b' / K_b)	
	LQM11	LQM16
10	1.05	1.02
30	0.98	1.23

The 8-anilinonaphthalene-1-sulfonic acid (ANS) is a probe that selectively binds to hydrophobic regions of the proteins [60]. The ANS presents weak fluoresce in an aqueous medium, however, in the presence of the lipase, the probe binding in the protein hydrophobic sites and occur a significant increase in the fluorescence intensity (Fig. S3). When a ligand is capable of binding to the same ANS site, it is displaced, and the fluorescence intensity is reduced. In this study, none of the guanyldiazones derivatives could replace the ANS (spectral overlap) of its hydrophobic site (Fig. S3A-B), which corroborates that main forces of complex formation are electrostatic based on thermodynamic parameters. Therefore, the binding site of LQM11 and LQM16 in the CRL should be a more polar region, compared at the ANS probe binding local.

3.2.5. Evaluation of the interaction process by ^1H NMR

In this study, it was possible to monitor changes in the ligands evaluated, while in the previous spectroscopic experiments, it was assessed variations resulting mainly to the modifications in the protein structure [61]. Thus, the chemical shift (δ) was one of the parameters selected to monitor the effect of the interaction of **LQM11** and **LQM16** with the CRL by the nuclear magnetic resonance of hydrogen (^1H NMR). The ^1H NMR spectra of **LQM11** and **LQM16** in the absence and presence of CRL with all of the hydrogens assigned are shown in Fig. 6.

Fig. 6. ^1H NMR spectra (400 MHz) of (A) **LQM11**, (B) and (C) **LQM16** in the absence and presence of CRL at pH 8.0 and 22°C. Sodium trimethylsilylpropionate (TMSP) was employed as an internal reference standard.

In the presence of an enzyme, the guanylylhydrazone derivatives signals were observed to be enlarged. However, the chemical shifts varied only for the hydrogens Ha and Hc of **LQM11** (Table S5), due to intermolecular interaction between this compound and the enzyme. The variation in the chemical shifts ($\Delta\delta$) for **LQM11** hydrogen atoms Ha and Hc in the absence and presence of CRL was ± 0.01 (Table S5). Thus, the region of the compound **LQM11** near the hydrogen atoms Ha and Hc (sites nearby the positive and negative charges of the compound), should be the epitope of the molecule, where the interaction process is most effective [26]. Finally, the ^1H NMR studies corroborate with the previous results, where the compound **LQM11** presented more significant interaction with the CRL in comparison to **LQM16**.

3.3. Evaluation of the interaction process by theoretical studies

3.3.1 Molecular dynamic

Initially, the generated 3D-structure of CRL enzyme by MD simulations was validated. The validation of the backbones and amino acid side chains for this model was performed by generating and analyzing the corresponding Ramachandran plots, which represent the distributions of the glycine and proline dihedral angles ϕ and ψ (Fig. S4).

The Ramachandran plotted was used to determine the validation of CRL enzyme generated by MD simulation. In a sense, it was verified that the 90% of the residues are in the most favored regions (dark blue) and 10%, in additional allowed regions (pale blue and orange). No amino acid residues were found in the disallowed region (white). The plots at the top- and bottom-left quadrants indicate that the model contains both α -sheet and α -helix structures (Fig. S4). Moreover, the plots at the top- and bottom-right quadrants represent the β -lid structure. Finally, these results prove that the model is highly plausible.

In general, CRL is active upon interfacial activation. Interfacial activation implies the opening of the lid, with the *cis-trans* isomerization of Pro92 and the shift of the lid almost 19.0 Å before the fatty acid can be adsorbed on the active site [62,63]. However, the only way that proline in the CRL's lid can suffer isomerization is upon protonation and change of the amide N to a transition state with an ammonium character. Water or even buffer of pH 7.0 is not acidic enough to protonate N from proline [64]. Additionally, it is suggested that the reaction mechanism of CRL involves acylation and deacylation steps, similar to those of serine protease [65,66].

The CRL structure relaxes to a root-mean-square deviation (RMSD) of about 3.15 Å during the first six ns of MD simulation. The low RMSD value indicates that the enzyme exhibits a little conformational deviation from its starting structure. Additionally, it was observed that the CRL-**LQM11** complex stabilization occurs about 8.5 ns (Fig. 7A), and for the CRL-**LQM16** complex, about 15.8 ns (Fig. 7B).

The conformational stability of CRL-**LQM11** and CRL-**LQM16** complexes were investigated during the MD simulation. For this propose, the RMSD from the initial structure throughout the simulation was analyzed. In the Fig. 7A, it is possible to suggest which there is a transition state for CRL-**LQM11** complex formation, at five ns, whose it is stabilized after eight ns of dynamic simulation. At transition state, there is an RMSD gap of 1.45 Å which fall to 0.4 Å, after complex formation, suggesting a good affinity between them. For the CRL-**LQM16** RMSD (Fig. 7B), it is observed that the transitional state is not transparent, but the complex stabilization (RMSD gap value of 0.8 Å) occurs about of 15 ns, suggesting that the **LQM16** no effectively interacts with CRL enzyme.

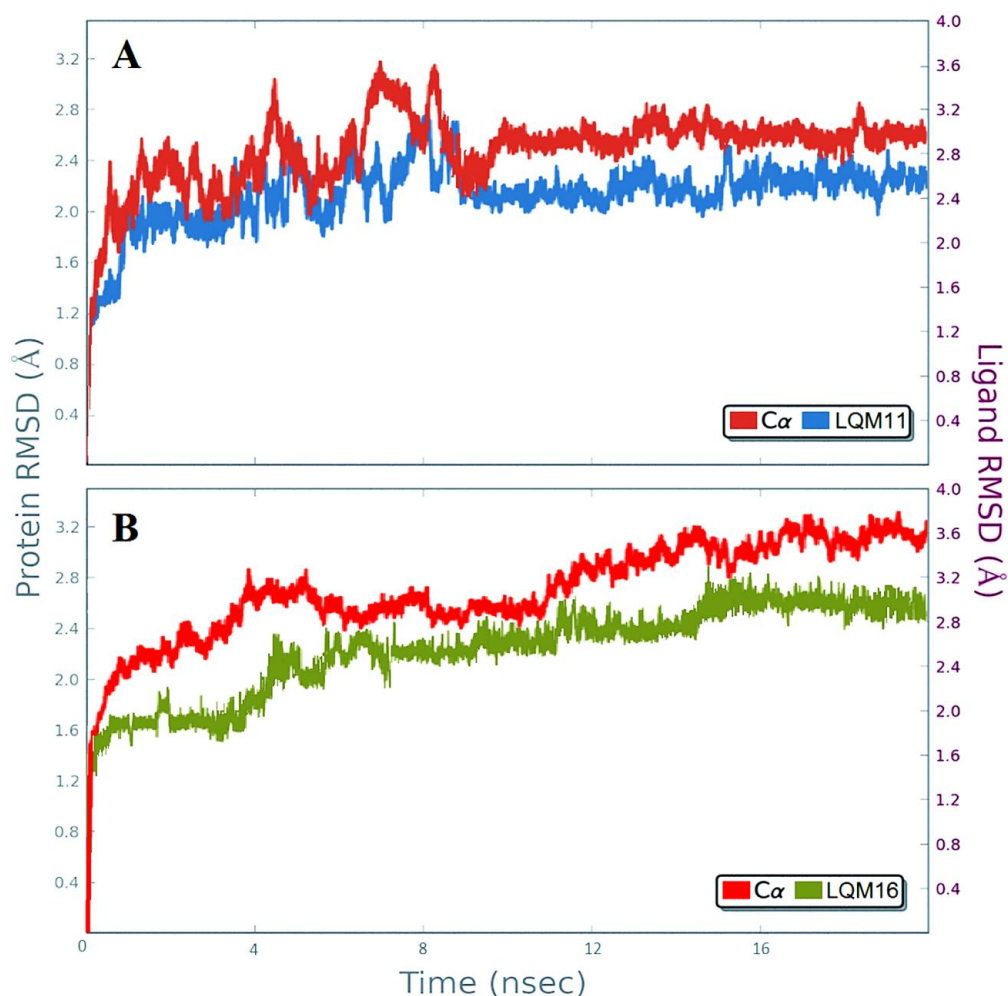


Fig. 7. Molecular dynamics trajectory plots correlating RMSD deviation from the initial CRL enzyme $\text{C}\alpha$ -atoms and (A) **LQM11** (blue) and (B) **LQM16** (green) coordinates over a simulation time of 20 ns.

Interestingly, crystals of CRL enzyme can be found in a closed conformation, with the hydrophobic pocket and catalytic triad (Ser209, Glu341, and His449) obscured, such as 1TRH.pdb structure. Thus, the enzyme may be closed when soluble and may open to engaging a fat droplet at the catalytic site [62,67]. This fact was confirmed by a comparative study of the CRL crystal structure from PDB and CRL structure generated by MD simulation (Fig. 8A). In both of case, it was observed the closed conformation for the lid which became the catalytic triad inaccessible, by results observed by Burney et al. [6]. Furthermore, it was verified that the **LQM11** and **LQM16** preferentially interact with a completely different active site, mainly on the opposite side of the CRL enzyme (Fig. 8B).

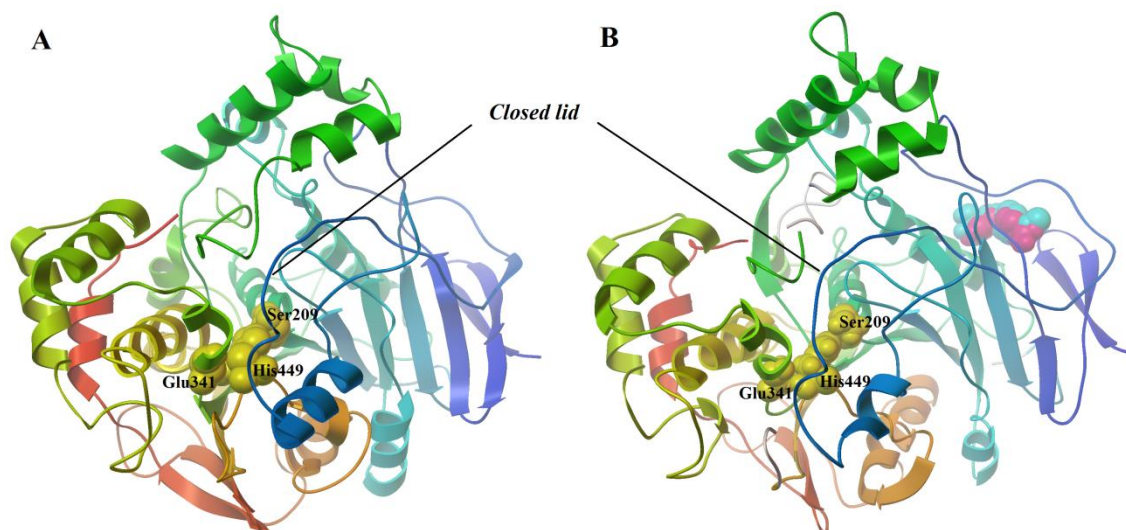


Fig. 8. A comparative view of the lid from CRL crystal structure PDB (A) and lid from CRL structure after dynamic simulation at pH 8.0 (B) **LQM11** (magenta) and **LQM16** (cyan) compounds are showed in the complex in the allosteric site.

Considering the closed lid conformation, the results corroborate with the hypothesis that there is an allosteric site, due to the monitoring of distances and positions of the side chains of the catalytic residues Ser209, Glu341 and His449 not showed any essential alterations in the structural organization of the catalytic triad, suggesting non-competitive inhibition, and which this hypothesis corroborates with the spectroscopic results.

3.3.2 Docking molecular

It is worth noticing that the **LQM11** and **LQM16** interact with a different binding pocket, considering the catalytic triad. This fact contributes to suggest that there is an allosteric binding site involved in the activity of these compounds, supported by the experimental results. In [Fig. 9](#) are shown all interactions for these guanyldiazone derivatives.

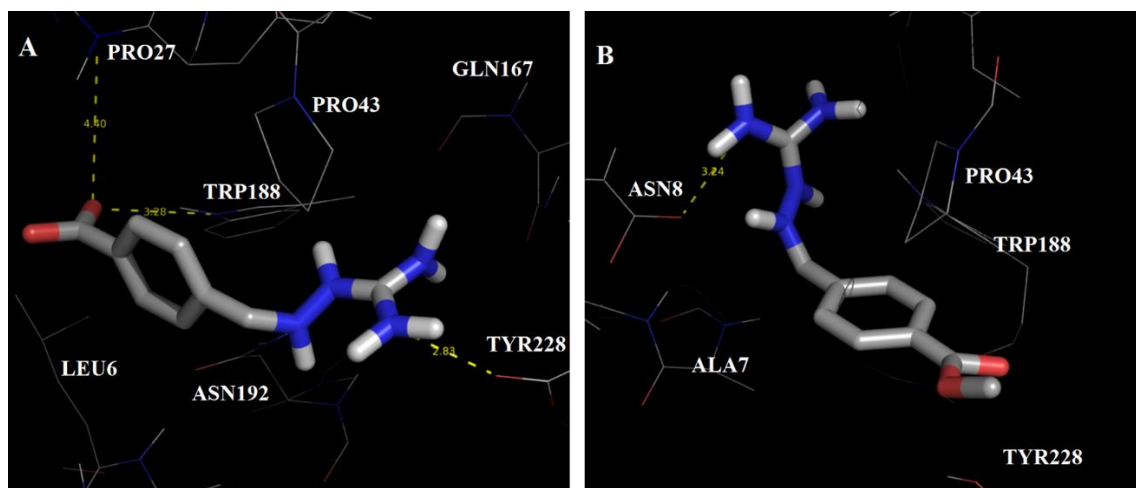


Fig. 9. Protein-ligand interactions for (A) **LQM11** and (B) **LQM16**. Yellow dots represent hydrogen bond interactions.

Based on docking molecular was verified that **LQM11** and **LQM16** compounds present van der Waals interactions with Pro43. Individually, the **LQM11** compound interacts with the Leu6, Gln187, and Asn192, hydrophobically. Also, it was also observed three H-bonds, such as COO^- group with $-\text{C}=\text{NH}_2^+$ at Trp188 (3.28 Å) and Pro27 (4.4 Å) residues; and $-\text{C}=\text{NH}_2^+$ group with COO^- at Tyr228 (2.83 Å) residue. These hydrogen interactions favor the complex stabilization and increase the affinity. In contrast, **LQM16** interacts with the Ala7, Trp188, and Tyr228 residues, hydrophobically. Moreover, there is an H-bond between $-\text{C}=\text{NH}_2^+$ and COO^- at Asn8 (3.24 Å) residue. Finally, it is possible to suggest that Pro43, Tyr188, and 228 amino acids should be considered as critical residues for allosteric modulation of CRL enzyme. However, Leu6, Pro27, Gln187, and Asn192 could contribute to the activity, as stabilizing residues.

3.3.3 Gibbs free energies of binding (ΔG) determination by density functional theory

Frequently, the algorithms used in molecular docking simulations are not able to predict accurate Gibbs free energies (ΔG) [63]. In a sense, quantum mechanical (QM) calculations can be applied as a safe method to predict ΔG values more reliable [42]. The binding pose for each ligand and their corresponding active sites were utilized as a starting

point, which was extracted from the molecular docking simulations. Based on this, DFT calculations using M06/6-31G(d) as the level of theory were applied to determine the corrected ΔG values from the CRL-guanyldrazone derivatives complexes formation. Finally, all energetic values were calculated as described in the methods section. The results for this evaluation are shown in [Table 4](#).

Table 4
Gibbs free energy (ΔG) values predicted by M06/6-31G(d).

Compounds	Energy (kcal mol ⁻¹)			ΔG (kcal mol ⁻¹)
	E_{complex}	E_{enzyme}	E_{ligand}	
LQM11	-2638883.624	-2188148.415	-450703.3515	-31.85
LQM16	-2206953.38	-1712400.95	-494540.6069	-11.82

It is possible to observe that there is a relationship between the experimental and the predicted ΔG values by M06/6-31G(d). The **LQM11** presented a high affinity to the CRL enzyme, with a ΔG value of -31.85 kcal mol⁻¹ ([Table 4](#)). In contrast, **LQM16** demonstrated a low affinity to the CRL, with a ΔG value of -11.82 kcal mol⁻¹. Interestingly, some information can be derived from these QM calculations. Considering the structural similarity between both guanyldrazone analogs is possible verified that there are significant energetic differences when all results are individually analyzed. In general, both compounds present similar E_{ligand} values, due to they have approximately the same number of atoms. Although, **LQM16** showed to be more stable in its free form than to **LQM11**.

In contrast, it was observed a high difference in the E_{complex} and E_{enzyme} values. Concerning the complex formation (E_{complex}), it was demonstrated that the **LQM11** presents an excellent value, suggesting that this compound effectively interacts with the CRL enzyme, where this fact confirm that the H-bonds observed in molecular docking simulations significantly contribute to the stability of this compound in CRL-**LQM11** complex formation. In contrast, **LQM16** presents only one H-bond, corroborating with its low E_{complex} value. Additionally, the binding site (E_{enzyme}) for **LQM11** is more stable than to **LQM16**, suggesting that larger binding sites are more stables. Finally, it is possible to suggest that these

compounds should not only have a high E_{complex} value, but their corresponding binding sites should have an excellent stability, thus contributing to final ΔG values.

3.4. Biotechnological application

As possible biotechnological applications proposed for use guanylylhydrazone derivatives, such as potential inhibitor compounds were also tested against the crude extract of guts from *Rhynchophorus palmarum* (Fig. 10A-B), an agricultural pest of economic importance [68]. In insect lipase, a similar inhibition profile for the guanylylhydrazone derivatives was observed in both tissues tested. The **LQM11** causes inhibition of 58% of the lipase activity in the foregut (Fig. 10C), and 79% in the hindgut (Fig. 10D). The **LQM16**, however, does not cause significant inhibition in the foregut, causing inhibition of only 17% in the hindgut (Fig. 10D).

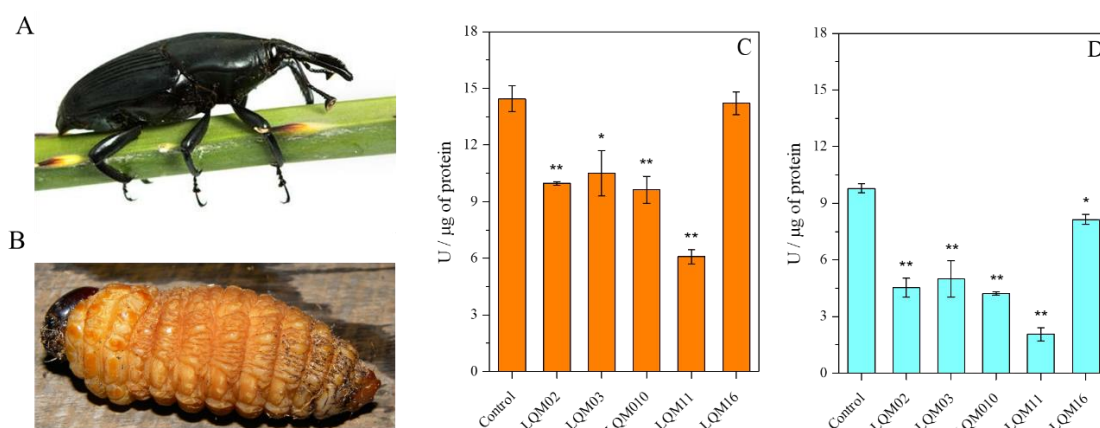


Fig. 10. *Rhynchophorus palmarum* (A) insect and (B) larvae picture. Inhibition of lipase activity of crude extract of the (C) foregut and (D) hindgut of *Rhynchophorus palmarum* larvae by the guanylylhydrazone derivatives. The error bars represent the SD for the three determinations (* $p < 0.05$).

The results of the inhibition of lipase activity of crude insect gut extracts demonstrated inhibition profile similar to that observed for inhibition in purified CRL enzyme. The use of the crude extract in this evaluation mimics the biological conditions that occur in the insect *in vivo*, where the enzyme exerts its operation in complex and heterogeneous composition medium. Thus, as the same inhibition profile was observed in this condition, the inhibition of

lipase activity by guanylhyazone derivatives may be an essential and potential tool for the control of agricultural pests through interference in the insect digestion process. However, more studies will be necessary to evaluate the real potential of this biotechnological application.

4. Conclusion

The biological, biophysical and theoretical studies carried out in this work are concordant that **LQM11** is a potent inhibitor of isolated enzyme lipases (CRL) and insect gut extracts. The guanylhyazone derivative **LQM11** showed high affinity for the enzyme and IC_{50} lower than that of Orlistat, showing to be a non-competitive inhibitor that binds preferably by electrostatic interaction to a specific allosteric site of the enzyme. Thus, **LQM11** proves to be a promising compound for use in the biotechnological application, but more studies are needed to evaluate the viability of this compound in this proposed.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Additionally, the authors thank the students and researcher fellowships and the support of IQB-PPGQB and ESENFAR-PPGCF/UFAL.

References

- [1] N. Mayer, M. Schweiger, M.C. Melcher, C. Fledelius, R. Zechner, R. Zimmermann, R. Breinbauer, Structure-activity studies in the development of a hydrazone based inhibitor of adipose-triglyceride lipase (ATGL), *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 2904-2916.
- [2] J. Lazić, V. Ajdačić, S. Vojnovic, M. Zlatović, M. Pekmezovic, S. Mogavero, I. Opsenica, J. Nikodinovic-Runic, Bis-guanylhydrazones as efficient anti-Candida compounds through DNA interaction, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 1889-1901.
- [3] V.R. Pinhatti, J. da Silva, T.L.C. Martins, Cytotoxic, mutagenicity, and genotoxicity effects of guanylhydrazone derivatives, *Mutat. Res.* 806 (2016) 1-10.
- [4] I. Papanastasiou, A. Tsotinis, G. Zoidis, N. Kolocouris, S.R. Prathalingam, J.M. Kelly, Design and synthesis of *Trypanosoma brucei* active 1-alkyloxy and 1-benzyloxyadamantano 2-guanylhydrazones, *Chem. Med. Chem.* 4 (2009) 1059-1062.
- [5] A. Andreani, S. Burnelli, M. Granaola, A. Leoni, A. Locatelli, R. Morigi, M. Rambaldi, L. Varoli, N. Calonghi, C. Cappadone, G. Farruggia, New antitumor imidazo[2,1-b]thiazole guanylhydrazones and analogues, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 809-816.
- [6] P.R. Burney, J. Pfaendtner, Structural and dynamic features of *Candida rugosa* lipase 1 in water, octane, toluene, and ionic liquids BMIM-PF6 and BMIM-NO₃, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 2662-2670.
- [7] S. Ding, J. Jiang, Z. Wang, G. Zhang, J. Yin, X. Wang, S. Wang, Z. Yu, Resveratrol reduces the inflammatory response in adipose tissue and improves adipose insulin signaling in high-fat diet-fed mice, *PeerJ*. 6 (2018) e5173.
- [8] H.M. Kim, Y.M. Kim, J.H. Huh, E.S. Lee, M.H. Kwon, B. R. Lee, H.J. Ko, C.H. Chung, α -Mangostin ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance by inhibition C-C chemokine receptor 2, *Plos One* 12 (2017) e0179204.
- [9] M.L. Foresti, M.L. Ferreira, Computational approach to solvent-free synthesis of ethyl oleate using *Candida rugosa* and *Candida antarctica* B lipases. I. Interfacial activation and substrate (ethanol, oleic acid) adsorption, *Biomacromolecules* 5 (2004) 2366-2375.
- [10] K.S. Hung, S.Y. Chen, H.F. Liu, B.R. Tsai, H.W. Chen, C.Y. Huang, J.L. Liao, K.H. Sun, S.J. Tang, C-terminal region of *Candida rugosa* lipases affects enzyme activity and interfacial activation, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5396-5401.
- [11] C. Otero, R. Castro, J. Soria, Electron paramagnetic resonance studies of spin-labeled fatty acid binding sites in *Candida rugosa* lipases, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 8611-8618.
- [12] S.Z. Wang, B.S. Fang, Microplate bioassay for determining substrate selectivity of *Candida rugosa* lipase, *J. Chem. Educ.* 89 (2012) 409-411.

- [13] M.S.S. Googheri, M.R. Housaindokht, H. Sabzyan, Reaction mechanism and free energy profile for acylation of *Candida antarctica* lipase B with methylcaprylate and acetylcholine: density functional theory calculations, *J. Mol. Graph. Model.* 54 (2014) 131-140.
- [14] A.S. de Miranda, L.S.M. Miranda, R.O.M. de Souza, Lipases: valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 372-393.
- [15] L.C. Lee, Y.T. Chen, C.C. Yen, T.C.Y. Chiang, S.J. Tang, G.C. Lee, J.F. Shaw, Altering the substrate specificity of *Candida rugosa* LIP4 by engineering the substrate-binding sites, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 5103-5108.
- [16] A. Srivastava, C.C. Akoh, S.W. Chang, G.C. Lee, J.F. Shaw, *Candida rugosa* lipase LIP1-catalyzed transesterification to produce human milk fat substitute, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5175-5181.
- [17] X. Li, C. Zhang, S. Li, H. Huang, Y. Hu, Improving catalytic performance of *Candida rugosa* lipase by chemical modification with polyethylene glycol functional ionic liquids. *Ind. Eng. Chem. Res.* 54 (2015) 8072-8079.
- [18] S. Velasco-Lozano, F. López-Gallego, R. Vázquez-Duhalt, J.C. Mateos-Díaz, J.M. Guisán, E. Favela-Torres, Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking, *Biomacromolecules* 15 (2014) 1896-1903.
- [19] C.C. Santana, L.A. Barbosa, I.D.B. Júnior, T.G.D. Nascimento, C.B. Dornelas, L.A.M. Grillo, Lipase activity in the larval midgut of *Rhynchophorus palmarum*: biochemical characterization and the effects of reducing agents, *Insects* 8 (2017) 100.
- [20] C.C. Santana, J.S. do Nascimento, M.M. Costa, A.T. da Silva, C.B. Dornelas, L.A.M. Grillo, Embryonic development of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae): dynamics of energy source utilization, *J. Insect Sci.* 14 (2014) 280.
- [21] P.H.B. França, E.F. Silva-Júnior, P.G.V. Aquino, A.E.G. Santana, J.N.S. Ferro, E. de Oliveira Barreto, C. do Ó Pessoa, A.S. Meira, T.M. Aquino, M.S. Alexandre-Moreira, M. Schmitt, J.X. Araújo-Júnior, Preliminary *in vitro* evaluation of the anti-proliferative activity of guanyldihydrazone derivatives, *Acta Pharm.* 66 (2016) 129-137.
- [22] S.J. Choi, J. M. Hwang, S. Kim, A colorimetric microplate assay method for high throughput analysis of lipase activity, *J. Biochem. Mol. Biol.* 36 (2003) 417-420.
- [23] P. Diaz, N. Prim, F.I. Javier Pastor, Direct fluorescence-based lipase activity assay, *Biotechniques* 27 (1999) 696-698.
- [24] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [25] T.C.A. Lage, T.M.S. Maciel, Y.C.C. Mota, F. Sisto, J.R. Sabino, J.C.C. Santos, I.M. Figueiredo, C. Masia, A. de Fátima, S.A. Fernandes, L.V. Modolo, *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* and interaction studies of lichen natural products with jack bean urease, *New J. Chem.* 42 (2018) 5356-5366.

- [26] M.D.A. Dantas, H.A. Tenório, T.I.B. Lope, H.J.V. Pereira, A.J. Marsaioli, I.M. Figueiredo, J.C.C. Santos, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 505-514.
- [27] J.C.N. Santos, I.M. Silva, T.C. Braga, A. de Fátima, I. M. Figueiredo, J.C.C. Santos, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 1032-1040.
- [28] M.F. Sanner, Python: A programming language for software integration and development, *J. Mol. Graph. Model.* 17 (1999) 57-61.
- [29] D.C. Bas, D.M. Rogers, J.H. Jensen, Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes, *Proteins: Struct Funct Bioinf.* 73 (2008) 765-783.
- [30] M.H.M. Olsson, C.R. Sondergaard, M. Rostkowski, J.H. Jensen, PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions, *J. Chem. Theory Comput.* 7 (2011) 525-537.
- [31] K. Świderek, S. Martí, V. Moliner, Theoretical study of primary reaction of pseudozyma antarctica lipase b as the starting point to understand its promiscuity, *ACS Catal.* 4 (2014) 426-434.
- [32] S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 50 (2003) 437-450.
- [33] V.Y. Martiny, F. Martz, E. Selwa, B.I. Iorga, Blind pose prediction, scoring, and affinity ranking of the CSAR 2014 dataset, *J. Chem. Inf. Model.* (2015) 151001125645007.
- [34] X. Du, E. Hansell, J.C. Engel, C.R. Caffrey, F.E. Cohen, J.H. McKerrow, Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents, *Chem. Biol.* 7 (2000) 733-742.
- [35] J. Correa-Basurto, C. Flores-Sandoval, J. Marín-Cruz, A. Rojo-Domínguez, L.M. Espinoza-Fonseca, J.G. Trujillo-Ferrara, Docking and quantum mechanic studies on cholinesterases and their inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 10-19.
- [36] X. Chen, QSAR and primary docking studies of trans-stilbene (TSB) series of imaging agents for β -amyloid plaques, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 763 (2006) 83-89.
- [37] B.D. Bursulaya, M. Totrov, R. Abagyan, C.L. Brooks, Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 17 (2003) 755-763.
- [38] M.D. Cummings, R.L. DesJarlais, A.C. Gibbs, V. Mohan, E.P. Jaeger, Comparison of automated docking programs as virtual screening tools, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 962-976.
- [39] M. Kontoyianni, G.S. Sokol, L.M. McClellan, Evaluation of library ranking efficacy in virtual screening, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 11-22.
- [40] G.L. Warren, C.W. Andrews, A.M. Capelli, B. Clarke, J. LaLonde, M.H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S.F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I.D. Wall, J.M. Woolven, C.E.

Peishoff, M.S. Head, A critical assessment of docking programs and scoring functions, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5912-5931.

[41] R.D. Malmstrom, S.J. Watowich, Using free energy of binding calculations to improve the accuracy of virtual screening predictions, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (2011) 1648-1655.

[42] E.F. Silva-Júnior, P. França, L. Quintas-Júnior, F. Mendonça-Junior, L. Scotti, M. Scotti, T.M. Aquino, J.X. Araújo-Júnior, Dynamic simulation, docking and DFT studies applied to a set of anti-acetylcholinesterase inhibitors in the enzyme β -Secretase (BACE-1): an important therapeutic target in Alzheimer's disease, *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* 13 (2017) 1-9.

[43] Spartan'14 for Windows, Macintosh and Linux - Tutorial and User's Guide, 2014.

[44] V.S. Bryantsev, M.S. Diallo, A.C.T. Van Duin, W.A. Goddard, Evaluation of B3LYP, X3LYP, and M06-class density functionals for predicting the binding energies of neutral, protonated, and deprotonated water clusters, *J. Chem. Theory Comput.* 5 (2009) 1016-1026.

[45] Y. Zhao, D.G. Truhlar, The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: Two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other function, *Theor. Chem. Acc.* 120 (2008) 215-241.

[46] E.J. Barreiro, A.E. Kümmerle, C.A.M. Fraga, The methylation effect in medicinal chemistry, *Chem. Rev.* 111 (2011) 5215-5246.

[47] K. Benarous, I. Bombarda, I. Iriepa, I. Moraleda, H. Gaetan, A. Linani, D. Tahri, M. Sebaa, M. Yousfi, Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: *in silico* and *in vitro* studies, *Bioorganic Chem.* 62 (2015) 1-7.

[48] P. Grochulski, Y. Li, J.D. Schrag, M. Cygler, Two conformational states of *Candida rugosa* lipase, *Protein Sci.* 3 (1994) 82-91.

[49] R. Zhang, Y. Liu, X. Huang, M. Xu, R. Liu, W. Zong, Interaction of a digestive protease, *Candida rugosa* lipase, with three surfactants investigated by spectroscopy, molecular docking and enzyme activity assay, *Sci. Total Environ.* 622-623 (2018) 306-315.

[50] J.R. Albani, Principles and applications of fluorescence spectroscopy; Wiley-Blackwell, Oxford (2007), 145-146.

[51] C.M. da Silva, M.M. Silva, F.S. Reis, A.L.T.G. Ruiz, J.E. Carvalho, J.C.C. Santos, I.M. Figueiredo, R.B. Alves, L.V. Modolo, A. de Fátima, Studies on free radical scavenging, cancer cell antiproliferation, and calf thymus DNA interaction of Schiff bases, *J. Photochem. Photobiol. B* 172 (2017) 129-138.

[52] S. Das, C.J. da Silva, M.M. Silva, M.D.A. Dantas, A. de Fátima, A.L.T.G. Ruiz, C.M. da Silva, J.E. Carvalho, J.C.C. Santos, I.M. Figueiredo, E.F. Silva-Júnior, T.M. Aquino, J.X. Araújo-Júnior, G. Brahmachari, L.V. Modolo, Highly functionalized piperidines: Free radical scavenging, anticancer activity, DNA interaction and correlation with biological activity, *J. Adv. Res.* 9 (2018) 51-61.

- [53] M.M. Silva, E.O.O. Nascimento, E.F. Silva-Júnior, J.X. Araújo-Júnior, C.C. Santana, L.A.M. Grillo, R.S. Oliveira, P.R.R. Costa, C.D. Buarque, J.C.C. Santos, I.M. Figueiredo, Interaction between bioactive compound 11a-*N*-tosyl-5-deoxy-pterocarpan (LQB-223) and Calf thymus DNA: spectroscopic approach, electrophoresis and theoretical studies, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 223-233.
- [54] P.D. Ross, S. Subramanian, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability, *Biochemistry* 20 (1981) 3096-3102.
- [55] M.M. Silva, F.C. Savariz, E.F. Silva, T.M. Aquino, M.H. Sarragiotto, J.C.C. Santos, I.M. Figueiredo, Interaction of β -carboline with DNA: Spectroscopic studies, correlation with biological activity and molecular docking, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 1558-1568.
- [56] L. Zhao, S. Hu, Q. Meng, M. Xu, H. Zhang, R. Liu, The binding interaction between cadmium-based, aqueous-phase quantum dots with *Candida rugosa* lipase, *J Mol Recognit.* (2018) e2712.
- [57] R. Zhang, L. Zhao, R. Liu, Deciphering the toxicity of bisphenol a to *Candida rugosa* lipase through spectrophotometric methods, *Photochem. Photobiol. B* 163 (2016) 40-46.
- [58] J. Zhang, L. Xiao, Y. Yang, Z. Wang, G. Li, Lignin binding to pancreatic lipase and its influence on enzymatic activity, *Food Chem.* 149 (2014) 99-106.
- [59] K. Benarous, I. Bombarda, I. Iriepa, I. Moraleda, H. Gaetan, A. Linani, D. Tahri, M. Sebaa, M. Yousfi, Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: in silico and in vitro studies, *Bioorg. Chem.* 62 (2015) 1-7.
- [60] I.M. Kuznetsova, A.I. Sulatskaya, O.I. Povarova, K.K. Turoverov, Reevaluation of ANS binding to human and bovine serum albumins: key role of equilibrium microdialysis in ligand - receptor binding characterization, *PLoS One* 7 (2012) e40845.
- [61] I.M. Figueiredo, A.J. Marsaioli, Screening protein-ligand interactions using ^1H NMR techniques for detecting the ligand, *Quim. Nova* 30 (2007) 1597-1605.
- [62] P. Grochulski, F. Bouthillier, R.J. Kazlauskas, A.N. Serreqi, J.D. Schrag, E. Ziomek, M. Cygler, Analogues of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase, *Biochemistry* 33 (1994) 3494-3500.
- [63] E.F. Silva-Júnior, J.X. Araújo-Júnior, T.M. Aquino, Quantum Mechanical (QM) Calculations applied to ADMET drug prediction: a review, *Curr. Drug Metab.* 18 (2017) 1-16.
- [64] M.L. Foresti, M.L. Ferreira, Computational approach to solvent-free synthesis of ethyl oleate using *Candida rugosa* and *Candida antarctica* B lipases. I. Interfacial activation and substrate (ethanol, oleic acid) adsorption, *Biomacromolecules* 5 (2004) 2366-2375.
- [65] C. Otero, R. Castro, J. Soria, Electron paramagnetic resonance studies of spin-labeled fatty acid binding sites in *Candida rugosa* lipases, *J. Phys. Chem. B.* 102 (1998) 8611-8618.

- [66] J. Barriuso, M.E. Vaquero, A. Prieto, M.J. Martínez, Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: a review, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 874-885.
- [67] S.A. Krawetz, D.D. Womble, 3D Molecular Visualization with Protein Explorer, in: *Intoduction to Bioinforma.*, 1a ed., Humana Press (2003) 565-585.
- [68] A.C. Viana, I.G. Ramos, E.L. Santos, A.J.S. Mascarenhas, M.S. Lima, A.E.G. Sant'Ana, J.I. Druzian, Validation of analytical method for rhynchophorol quantification and stability in inorganic matrix for the controlled release of this pheromone, *Chem. Cent. J.* 12 (2018) 54.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Evaluation of guanyldrazone derivatives as digestive lipase inhibitors from *Candida rugosa*: biological, biophysical, theoretical studies and biotechnological application

Camilla C. Santana^a, Edeildo F. Silva-Júnior^{a,b}, Giovanni O. Leoncini^{a,b}, João César N. Santos^b, Isabela M. da Silva^b, João X. Araújo-Júnior^{a,b}, Leandro A. Oliveira Barbosa^c, Camila B. Dornelas^a, Isis M. Figueiredo^b, Josué Carinhonha C. Santos^{b,*} and Luciano Aparecido M. Grillo^{a,*}

^aLaboratory of Medicinal Chemistry, Nursing and Pharmacy School, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil.

^bChemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil.

^cLaboratory of Cell Biochemistry, Federal University of São João del Rei, Dona Lindú Centro-Oeste Campus, Divinópolis, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding authors:

✉ E-mail address (JCCS): josue@iqb.ufal.br / Phone: +55 82 3214-1347

✉ E-mail address (LAMG): lucianomeirelesgrillo@gmail.com / Phone: +55 82 3214 1154

Figures

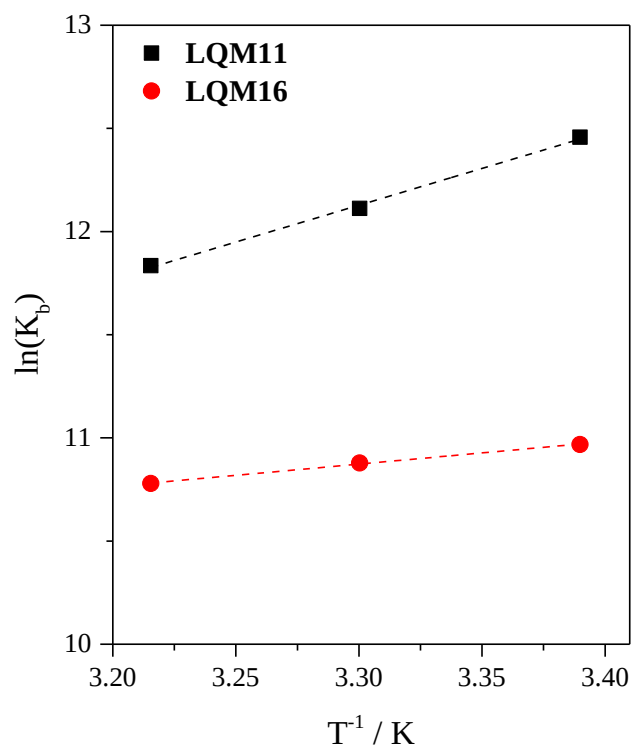


Fig. S1. Van't Hoff plot for the systems CRL-LQM11 and CRL-LQM16. Based on the K_b and temperature values of Table 1.

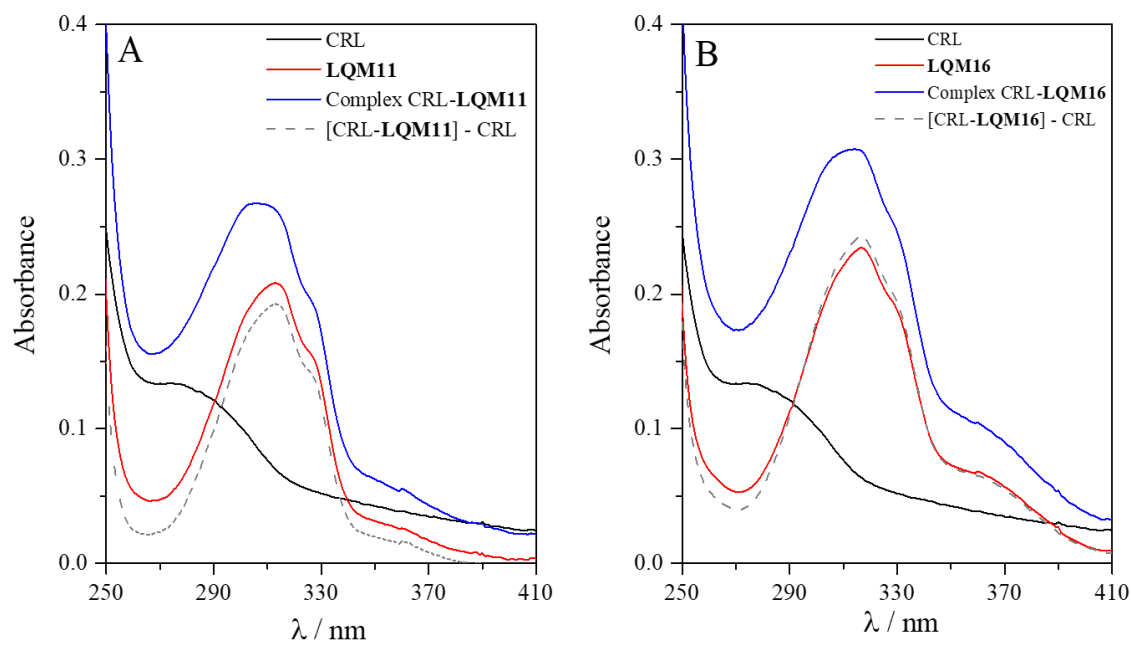


Fig. S2. Absorption spectra of CRL (0.2 mg mL^{-1}), (A) **LQM11** ($10 \text{ }\mu\text{M}$), CRL + **LQM11** mixture, the spectral difference (CRL + **LQM11**) – CRL and (B) **LQM16** ($10 \text{ }\mu\text{M}$), CRL + **LQM16** mixture and the spectral difference (CRL + **LQM16**) – CRL. Conditions: pH of 8.0 at 30°C .

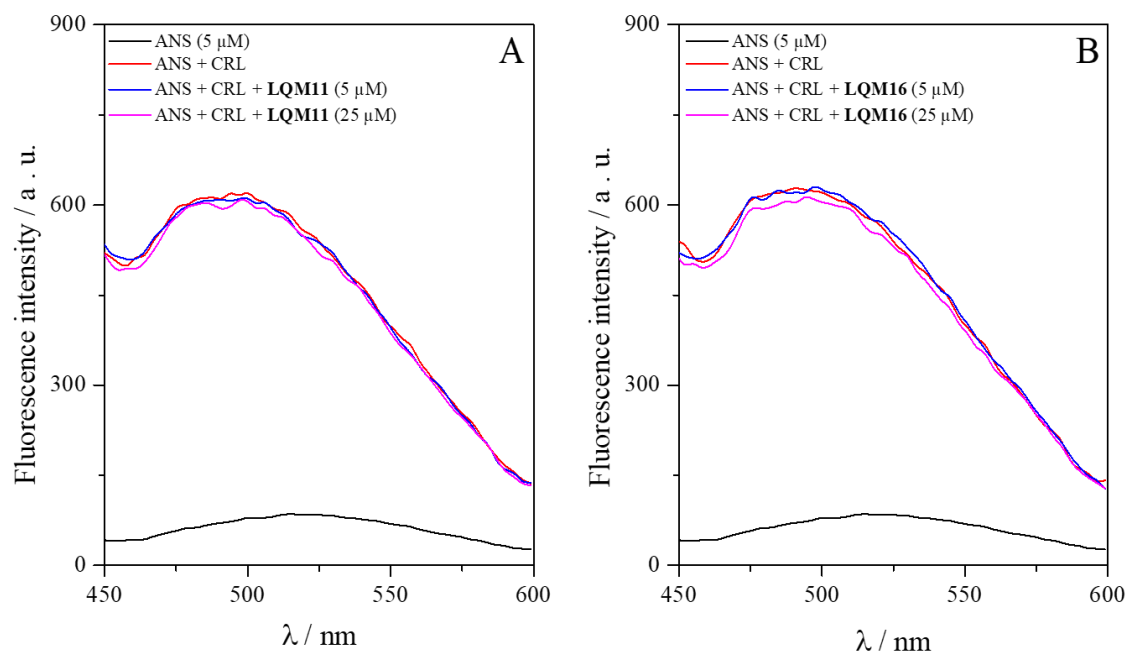


Fig. S3. Evaluation of competition of (A) **LQM11** and (B) **LQM16** with ANS by hydrophobic sites on CRL. Conditions: pH of 8.0 at 30°C .

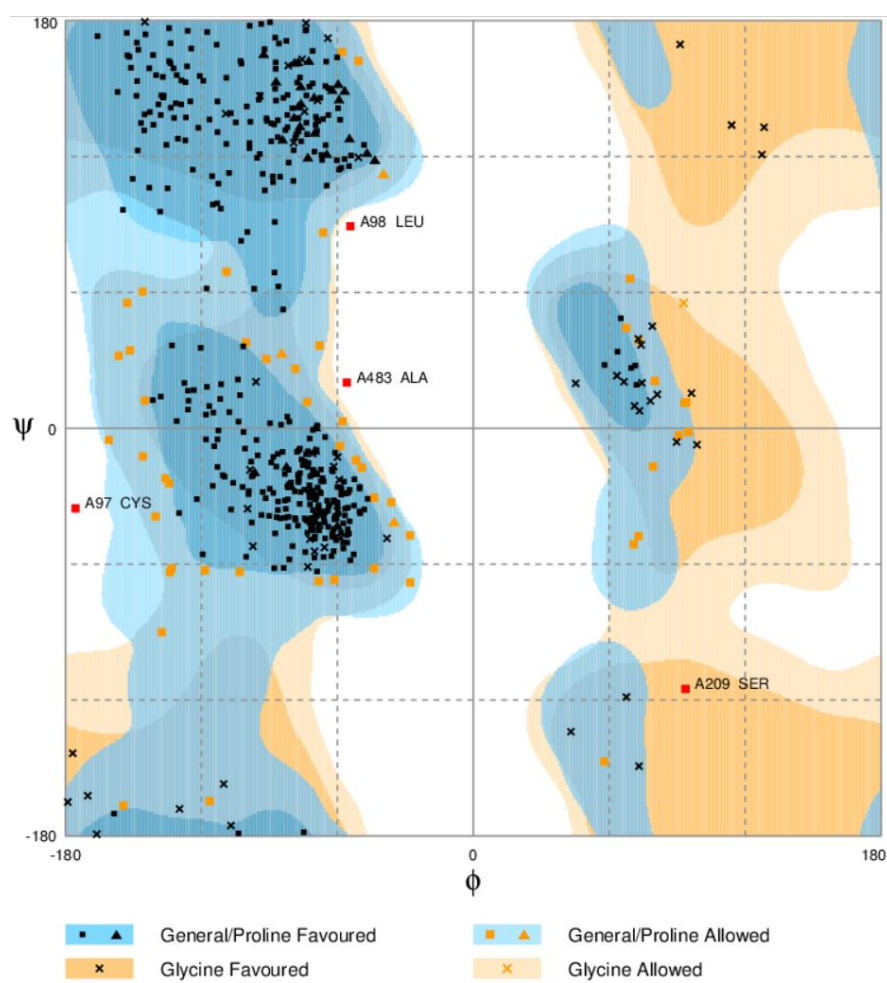


Fig. S4. Ramachandran plots showing the distribution of the Phi (ϕ) and Psi (ψ) dihedral angles of the amino acid side chains (Glycine and Proline) in the model of CRL enzyme.

Tables

Table S1

IC₅₀ values (*in vitro*) of lipase inhibition from synthetic and natural compounds.

Compound and derivatives	Type	Lipase model	IC ₅₀ (μM) ²	Reference
1,3,4-oxadiazol-2-ones (<i>ortho</i> -substituted, <i>n</i> ¹ = 06)	Synthetic compounds	Human recombinant monoacylglycerol	0.22 - 22	[1]
Phenylboronic acids derivatives (<i>n</i> = 10)	Synthetic compounds	Endothelial lipase	0.1 - 22	[2]
Pinacol(phenylboronate) esters derivatives (<i>n</i> = 14)	Synthetic compounds	Endothelial lipase	1.0 - 300	[2]
Longifolene	Natural compound	Porcine pancreatic pancreas	25.10	[3]
Diaryl substituted pyrazolyl thiazolidinediones (<i>n</i> = 6)	Synthetic compounds	Porcine pancreatic pancreas	10.30 - 18.81	[4]
Benzimidazole derivatives (<i>n</i> = 14)	Synthetic compounds	Porcine pancreatic pancreas	0.98 - 5.64	[5]
2-(carbazol-3-yl)-2-oxoacetamides derivatives (<i>n</i> = 24)	Synthetic compounds	Porcine pancreatic pancreas	6.31 - 56.18	[6]
Carbamate derivatives (<i>n</i> = 9)	Synthetic compounds	Monoacylglycerol lipase	4.5 - 13.4	[7]
β-Aescin (saponin)	Natural compounds	<i>Candida rugosa</i>	8.0	[8]
Digitonin (saponin)			24.0	
(±)-Catechin (flavonoid)			6300	
Rescinnamine (alkaloid)			160	
Benzylisoquinoline derivatives (<i>n</i> = 32)	Natural compounds and synthetic compound	Porcine pancreatic pancreas	10.28 - > 100	[9]
Caffeic acid	Natural compounds	Porcine pancreatic pancreas	401.5	[10]
<i>p</i> -Coumaric acid			170.2	
Quercetin			6.1	
Quercetin	Natural compound	<i>Candida rugosa</i>	800	[11]
Tetracycline	Synthetic compound		2500	
3- <i>O</i> - <i>trans</i> - <i>p</i> -coumaroyl actinidic acid	Natural compounds	Porcine pancreatic pancreas	14.95	[12]
Ursolic acid			15.83	
Asiatic acid			76.45	
Betulinic acid			21.10	
Rutin			15.88	
Quercetin	Natural compounds	Porcine pancreatic pancreas	49.33	[13]
Isoquercetin			23.71	
Quinazolinone-coumarin hybrids derivatives (<i>n</i> = 18)	Synthetic compounds	Porcine pancreatic pancreas	2.85 - 6.49	[14]
Orlistat	Synthetic compound	Porcine pancreatic pancreas	0.99	[4]
			0.0007	[5]
			1.01	[9]
			4.0	[10]
			0.32	[12]
Orlistat	Synthetic compound	<i>Candida rugosa</i>	137.2	[15]
Guanyldihydrazone derivative (LQM11)	Synthetic compound	<i>Candida rugosa</i>	14.70	This work

¹*n* = number of derivatives evaluated // ²value of IC₅₀ or range (min – max) based on the set of compounds evaluated.

References:

[1] H. Käsänen, A. Minkkilä, S. Taupila, J. Z. Patel, T. Parkkari, M. Lahtela-Kakkonen, S. M. Saario, T. Nevalainen, A. Poso, Eur. J. Pharm. Sci. 49 (2013) 423-433.

- [2] D. P. O'Connell, D. F. LeBlanc, D. Cromley, J. Billheimer, D. J. Rader, W.W. Bachovchin, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 22 (2012) 1397-1401.
- [3] M. Wang, D. Gu, H. Li, Q. Wang, J. Kang, T. Chu, H. Guo, Y. Yang, J. Tian, *Phytochemistry* 141 (2017) 114-120.
- [4] S. N. C. Sridhar, D. Bhurta, D. Kantiwal, G. George, V. Monga, A. T. Paul, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 3749-3754.
- [5] E. Mentès, F. Yılmaz, M. Emirik, S. Ülker, B. Kahveci, *Bioorganic Chem.* 76 (2018) 478-486.
- [6] S. N. C. Sridhar, G. Ginson, P. O. V. Reddy, M. P. Tantak, D. Kumar, A. T. Paul, *Bioorganic Med. Chem.* 25 (2017) 609-620.
- [7] S. Lauria, C. Perrotta, S. Casati, I. Di Renzo, R. Ottria, I. Eberini, L. Palazzolo, C. Parravicini, P. Ciuffreda, *Bioorganic Med. Chem.* 26 (2018) 2561-2572.
- [8] C. Ruiz, S. Falcocchio, E. Xoxi, L. Villo, G. Nicolosi, F. I. J. Pastor, P. Diaz, L. Saso, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 40 (2006) 138-143.
- [9] T. Feng, L. V. Hao-Yu, Z. Ji-Long, W. Yi, D. Meng-Jun, C. Xiao-Qin, L. Dan, Z. Liang, J. Jian-Qin, *Chin J Nat Med.* 14 (2016) 382-390.
- [10] A. I. Martinez-Gonzalez, E. Alvarez-Parrilla, Á. G. Díaz-Sánchez, L. A. de la Rosa, J. A. Núñez-Gastélum, A. A. Vazquez-Flores, G. A. Gonzalez-Aguilar, *Food Technol. Biotechnol.* 55 (2017) 519-530.
- [11] M. T. Gatto, S. Falcocchio, E. Grippa, G. Mazzanti, L. Battinelli, G. Nicolosi, D. Lambusta, L. Saso, *Bioorganic Med. Chem.* 10 (2002) 269-272.
- [12] D. S. Jang, G. Y. Lee, J. Kim, Y. M. Lee, J. M. Kim, Y. S. Kim, J. S. Kim, *Arch Pharm Res* 31 (2008) 666-670.
- [13] Y. Q. Li, P. Yang, F. Gao, Z. W. Zhang, B. Wu, *Eur Food Res Technol* 233 (2011) 63-69.
- [14] E. Mentese, N. Karaali, G. Akyüz, F. Yılmaz, S. Ülker, B. Kahveci, *Chem. Heterocycl. Compd.* 52 (2016) 1017-1024.
- [15] K. Benarous, I. Bombarda, I. Iriepa, I. Moraleda, H. Gaetan, A. Linani, D. Tahri, M. Sebaa, M. Yousfi, *Bioorganic Chem.* 62 (2015) 1-7.

Table S2Binding constant (K_b) values of lipase interaction with synthetic and natural compounds.

Compound	Type	Lipase model	pH	K_b (M^{-1})	Temperature ($^{\circ}C$)	Reference
(-)-epigallocatechin gallate	Natural products	Porcine pancreas	7.4	8.82×10^3	37	[1]
(-)-galliccatechin gallate				7.40×10^2		
(-)-epicatechin gallate				8.24×10^3		
(-)-epigallocatechin				7.55×10^3		
Quercetin	Natural products	Porcine pancreas	7.4	1.44×10^5	37	[2]
Isoquercetin				0.88×10^5		
Rutin				2.19×10^5		
1-butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborate	Ionic liquid (synthetic)	<i>Candida rugosa</i>	7.4	11.0	40	[3]
(-)-epigallocatechin-3-gallate	Natural products	Porcine pancreas	7.5	2.70×10^4	37	[4]
Lignin	Natural products	Porcine pancreas	8.2	1.01×10^4	34	[5]
Sodium dodecyl benzene sulfonate (surfactant)	Synthetic compounds	<i>Candida rugosa</i>	7.4	1.99×10^3	25	[6]
3-mercaptopropionic acid-capped CdTe	Nanomaterial	<i>Candida rugosa</i>	7.4	5.21×10^8	37	[7]
Guanyldihydrazone derivative: LQM11	Synthetic compounds	<i>Candida rugosa</i>	8.0	4.48×10^5	38	This work
Guanyldihydrazone derivative: LQM16				4.10×10^4		

References:

- [1] S. Wang, Z. Sun, S. Dong, Y. Liu, Y. Liu, Plos One 9(11) (2014) 1-10.
- [2] Y.Q. Li, P. Yang, F. Gao, Z.W. Zhang, B. Wu, Eur Food Res Technol 233 (2011) 63-69.
- [3] Y. Fan, X. Dong, X. Li, Y. Zhong, J. Kong, S. Hua, J. Miao, Yan Li, Spectrochim. Acta A 159 (2016) 128-133.
- [4] X. Wu, W. He, L. Yao, H. Zhang, Z. Liu, W. Wang, Y. Ye, J. Cao, J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 8829-8835.
- [5] J. Zhang, L. Xiao, Y. Yang, Z. Wang, G. Li, Food Chem 149 (2014) 99-106.
- [6] R. Zhang, Y. Liu, X. Huang, M. Xu, R. Liu, W. Zong, Sci. Total Environ. 622-623 (2018) 306-315.
- [7] L. Zhao, S. Hu, Q. Meng, M. Xu, H. Zhang, R. Liu, J Mol Recognit. in press (2018).

Table S3

Absorbance values of the evaluated compounds (**LQM11** and **LQM16**) at 10 μM , CRL (0.2 mg mL⁻¹) and respective the complexes formed. Conditions: pH of 8.0 at 30°C.

Compound	λ_{max} (nm)	A_{compound}	A_{CRL}	Comparison		ΔA^1
				$A_{\text{compound}} + A_{\text{CRL}}$	A_{complex}	
LQM11	313	0.208	0.070	0.278	0.262	0.016
LQM16	317	0.234	0.063	0.297	0.306	0.009

$$^1\Delta A = (A_{\text{compound}} + A_{\text{CRL}}) - A_{\text{complex}}$$

Table S4

Synchronous fluorescence binding parameters for compounds **LQM11** and **LQM16** towards CRL in simulated physiological condition. Conditions: pH of 8.0 at 30°C.

Compound	$\Delta\lambda$ (nm)	Stern-Volmer parameters		Maximal emission shift (nm) ¹
		$K_{\text{SV}} (10^5 \text{ M}^{-1})$	r	
LQM11	15	1.38 ± 0.09	0.9898	+ 25
	60	0.31 ± 0.01	0.9909	- 3
LQM16	15	1.12 ± 0.09	0.9831	+ 28
	60	0.38 ± 0.02	0.9868	- 4

¹Free CRL was used as reference against the system with CRL and the ligands at 60 μM .

Table S5

¹H NMR chemical shift (δ) of **LQM11** and **LQM16** in the absence and presence of CRL. Conditions: Compounds (1 mM) and CRL (0.4 mg mL⁻¹) in phosphate buffer (10 mM) at pH 8.0 employed D₂O and 22°C.

Hydrogen	δ (ppm), multiplicity, J^1		$\Delta\delta^2$	δ (ppm), multiplicity, J^1		$\Delta\delta^2$
	LQB11	CRL- LQM11		LQB16	CRL- LQM16	
H _a	8.18, s	8.17, s	-0.01	8.18, s	8.18, s	0
H _b	7.79, d, 9.8 Hz	7.79, d, 10 Hz	0	7.79, d, 10 Hz	7.89, d, 12 Hz	0
H _c	7.89, d, 9.8 Hz	7.90, d, 10 Hz	+0.01	7.89, d, 10 Hz	7.89, d, 12 Hz	0
H _d	-	-	-	3.36, s	3.36, s	0

²Multiplicity: s = singlet and d = doublet, J = coupling constant (Hz).

¹The $\Delta\delta$ was calculated based on difference between $\delta(\text{LQM11 or LQM16})$ and $\delta(\text{complex})$ with CRL.

ANEXO B - Produção não-referente à tese publicada na Revista *Insects*