



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Matheus Paiva Santos Tavares

***Tribolium castaneum* como modelo para estudo de obesidade: efeitos de dietas hipercalóricas no metabolismo e fisiologia do inseto**

Rio de Janeiro

2024

Matheus Paiva Santos Tavares

***Tribolium castaneum* como modelo para estudo de obesidade: efeitos de dietas hipercalóricas no metabolismo e fisiologia do inseto**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. David Majerowicz

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T231 Tavares, Matheus Paiva Santos.

Tribolium castaneum como modelo para estudo de obesidade: efeitos de dietas hipercalóricas no metabolismo e fisiologia do inseto / Matheus Paiva Santos Tavares. - 2024.

94 f.

Orientador: Prof. Dr. David Majerowicz

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Gorduras na Dieta – Metabolismo – Teses. 2. Obesidade – Dietoterapia – Teses. 3. Diabetes Mellitus Tipo 2 – Dietoterapia – Teses. I. Majerowicz, David. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.379-008.6

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Matheus Paiva Santos Tavares

***Tribolium castaneum* como modelo para estudo de obesidade: efeitos de dietas hipercalóricas no metabolismo e fisiologia do inseto**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em 30 de julho de 2024.

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. David Majerowicz (Orientador)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Mariana Renovato Martins

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Vanessa de Souza Mello

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Isabela Barbosa Ramos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Helena Maria Marcolla Araujo

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação à minha irmã, Laís Paiva, por todo apoio, amor e por sua trajetória. Esse trabalho é uma conquista tanto minha quanto sua, que ele faça jus à nossa fraternidade. Eu continuo aqui por mim e por você. Dedico também a todos os jovens da comunidade LGBTQIAPN+ que aspiram em conquistar seu espaço na sociedade. Que todos encontrem conforto e amor por onde quer que passem. Essa dissertação é símbolo de resiliência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rosa Maria e Paulo Sérgio, por todo apoio que me deram até aqui. Que todo esforço e dedicação ao meu trabalho represente uma conquista nossa, pois eu não seria metade do que sou hoje sem o amor e o cuidado de vocês. Obrigado pelo amor, carinho, pelas palavras de coragem e por nunca me deixarem desistir, além de sempre confiarem e encorajarem meus desejos de vida. Amo vocês mais do que sou capaz de expressar.

À minha irmã querida, Laís Paiva, por ser símbolo de coragem e enfrentamento. Obrigado por ser minha inspiração. Minha maior referência, desde pequeno, sempre foi você.

Aos meus padrinhos e pais de coração, Maria Angélica e Chagas Filho, pelo amor, apoio, carinho e dedicação. Sou muito feliz por ter vocês na minha vida.

Ao meu companheiro de vida, meu namorado, Daniel Bressan de Andrade, por toda dedicação, paciência, conselhos, sugestões e por melhorar meu projeto. Metade do meu trabalho foi acompanhado por você e pela sua inteligência. Obrigado por ser uma referência como cientista, marido e pai de pet. Casar com você foi um dos meus maiores acertos. Amo você e nosso Dino, que me traz alegria, conforto (e pelos) todos os dias. Obrigado pela nossa família.

Ao meu orientador, David Majerowicz, pela dedicação ao nosso projeto e por confiar em mim e no meu trabalho. Obrigado por ser minha inspiração diária, por todos os abraços, as conversas e pelos esporros também. Se eu me tornar metade do pesquisador que você é, já terei conquistado o mundo. Que esse trabalho faça jus ao seu nome. Além de orientador, você é meu amigo.

A todos os meus amigos que me apoiaram, com destaque especial para Alessa Macedo e Julia Moura por todos esses anos na bancada compartilhando conhecimento, lições de vida e experimentos, Germano Vilela e João Pedro pela amizade duradoura, paciência e fraternidade.

Agradecimento especial ao professor Rafael Mesquita e Márcio Wilson pela colaboração com a análise dos dados transcriptômicos, e a Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRJ pelas análises de lipidômica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

When I stand before God at the end of my life, I hope that I don't have a single bit of talent left, and say: I used everything you gave me.

Lana Del Rey

RESUMO

TAVARES, Matheus Paiva Santos. ***Tribolium castaneum* como modelo para estudo de obesidade: efeitos de dietas hipercalóricas no metabolismo e fisiologia do inseto.** 2024. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A obesidade causa graves consequências para a saúde dos indivíduos, desencadeando doenças como diabetes tipo II, hipertensão e outras. No Brasil, algumas previsões indicam que, até 2050, a maioria de sua população estará obesa e os gastos com tratamentos podem alcançar centenas de bilhões de dólares. A ausência de medicamentos eficazes, seguros e baratos para tratar a obesidade reduz as opções para combater essa doença. As semelhanças entre as vias metabólicas e de sinalização em insetos e mamíferos apoiam o uso desses artrópodes como modelos para investigar essa área. Além disso, dados genômicos e transcriptômicos e a eficiência da ferramenta RNAi corroboram o uso do besouro *Tribolium castaneum* como um modelo atraente para essa questão. Este projeto teve como objetivo investigar os efeitos de dietas hipercalóricas no metabolismo lipídico de *T. castaneum* e estabelecer o besouro como modelo para estudar obesidade e diabetes tipo II. As larvas foram alimentadas com farinha de trigo suplementada com várias fontes hipercalóricas, como azeite ou pó de gema de ovo (dieta rica em lipídeo), triptona (dieta rica em proteínas) e sacarose ou glicose (dietas ricas em carboidratos). A quantidade de triacilglicerol (TAG), carboidrato total, glicogênio e trealose foi medida usando um ensaio colorimétrico, enquanto a atividade da ATP-citrato liase (ACLY) foi medida usando um ensaio enzimático acoplado. Os lipídeos totais foram extraídos e analisados por espectrometria de massa. A expressão gênica foi determinada por PCR quantitativo e RNAseq. A suplementação com azeite causou um aumento no TAG em todo o corpo e retardou o crescimento das larvas. Outras dietas hipercalóricas foram testadas, mas apenas foi possível observar um aumento significativo no TAG em uma dieta de triptona de 10% (p/p). Quanto à expressão gênica, a dieta suplementada com azeite aumentou os níveis de carnitina palmitoiltransferase (CPT-1), um gene envolvido na beta-oxidação, e diacilglicerol aciltransferase (DGAT), um gene responsável por converter diacilglicerol em TAG. Por outro lado, uma dieta rica em proteínas diminuiu a expressão de genes relacionados à via anabólica de lipídeos, como a ácido graxos sintase (FAS) e a acetil-CoA carboxilase (ACC). A atividade enzimática da ACLY não apresentou alterações em larvas alimentadas com proteína. Além disso, dados transcriptômicos mostram níveis aumentados de genes relacionados a processos cuticulares. Os níveis de glicogênio aumentaram em uma dieta suplementada com azeite, enquanto diminuíram em uma dieta rica em proteínas. Esses resultados indicam que dietas hipercalóricas parecem induzir fenótipos semelhantes à obesidade e diabetes em *T. castaneum*, mas são necessárias investigações adicionais para confirmar esse besouro como um modelo para estudar doenças metabólicas.

Palavras-chave: dietas hipercalóricas; *Tribolium castaneum*; triacilglicerol; obesidade; metabolismo de lipídeos.

ABSTRACT

TAVARES, Matheus Paiva Santos. *Tribolium castaneum* as a model to study obesity: effects of hypercaloric diets on the metabolism and physiology of the insect. 2024. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Obesity causes severe consequences to people's health, leading to diseases like type II diabetes, hypertension, and others. In Brazil, some predictions indicate that, by 2050, most of its population will be obese, and the expenses for treatments could reach hundreds of billions of dollars. The absence of effective, safe, and cheap drugs to treat obesity reduces the options to combat this disease. The similarities between the metabolic and signaling pathways in insects and mammals support using these arthropods as models to investigate this area. Furthermore, genomic and transcriptomic data and RNAi tool efficiency corroborate using the beetle *Tribolium castaneum* as an attractive model. This project aimed to investigate the effects of hypercaloric diets on the lipid metabolism of *T. castaneum* and to establish the beetle as a model to study obesity and type II diabetes. Larvae were fed wheat flour supplemented with various hypercaloric sources such as olive oil or egg yolk powder (high-fat diet), tryptone (high-protein diet), or sucrose or glucose (high-sugar diet). The amount of triacylglycerol (TAG), total sugar, glycogen, and trehalose was measured using a colorimetric assay, while ATP-citrate lyase (ACLY) activity was measured using a coupled enzymatic assay. Total lipids were extracted and analyzed by mass spectrometry. Gene expression was determined by quantitative PCR and RNAseq. Olive oil supplementation caused an increase in TAG in the whole body and delayed larval growth. Other hypercaloric diets were tested, but it was only possible to observe a significant increase in TAG with a 10% w/w tryptone diet. As for gene expression, a diet supplemented with olive oil increased levels of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1), a gene involved in beta-oxidation, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a gene responsible for converting diacylglycerol into TAG. On the other hand, a high-protein diet decreased the expression of genes related to the lipid anabolic pathway, such as fatty acid synthase (FAS) and acetyl-CoA carboxylase (ACC). The enzymatic activity of ACLY did not show any changes in larvae fed with protein. Moreover, transcriptomic data showed increased levels of genes related to cuticular processes. Glycogen levels increased in an olive oil-supplemented diet, while they decreased in a high-protein diet. These results indicate that hypercaloric diets induce phenotypes similar to obesity and diabetes in *T. castaneum*. However, further investigations are needed to confirm this beetle as a model to study metabolic diseases.

Keywords: hypercaloric diets; *Tribolium castaneum*; triacylglycerol; obesity; lipid metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Taxa de mortalidade por obesidade ao redor do mundo, em 2019	17
Figura 2 –	Comorbidades que estão associadas à obesidade	18
Figura 3 –	Mecanismo de ação de fármacos no tratamento da obesidade	21
Figura 4 –	Relacionamentos positivos (verde) e negativos (cinza) entre insetos em relação a contextos com implicação para saúde pública	22
Figura 5 –	Sistemas biológicos conservados em humanos e insetos	23
Figura 6 –	Similaridades entre os fatores humanos e dos insetos correlacionados com a obesidade	24
Figura 7 –	Ciclo de vida do <i>Tribolium castaneum</i>	27
Figura 8 –	Estrutura, síntese e degradação de gotículas de lipídeos	29
Figura 9 –	Metabolismo de lipídeos em insetos a nível celular	30
Figura 10 –	Mecanismo de ação do hormônio adipocinético (AKH)	31
Figura 11 –	Mecanismo de ação dos peptídeos similares à insulina (ILPs)	32
Figura 12 –	Entrada de ácido graxo na mitocôndria através do sistema transportador acilcarnitina – carnitina	35
Figura 13 –	Representação esquemática da β -oxidação	36
Figura 14 –	Dietas suplementadas com glicose ou frutose não alteram a quantidade de lipídeo das larvas de <i>T. castaneum</i>	53
Figura 15 –	Dieta hiperproteica não altera a quantidade de TAG	55
Figura 16 –	Duas fontes de dietas hiperlipídicas, azeite e gema de ovo em pó. Apenas a dieta suplementada com azeite aumenta significativamente a quantidade de TAG dos insetos alimentados	56
Figura 17 –	Larvas alimentadas com dieta suplementada com azeite apresentam um atraso no crescimento e um aumento na mortalidade de forma dose-dependente	57
Figura 18 –	Larvas alimentadas com dieta suplementada com gema de ovo em pó também apresentam um atraso no crescimento e um aumento na mortalidade de forma dose-dependente	58
Figura 19 –	Larvas alimentadas com azeite apresentam alterações nos níveis de alguns genes do metabolismo de lipídeos	59
Figura 20 –	Larvas alimentadas com azeite apresentam alteração em um gene	

	relacionado ao metabolismo de carboidratos e sinalização endócrina.	60
Figura 21 –	Larvas alimentadas com triptona apresentam alterações em genes do metabolismo lipídico	61
Figura 22 –	Larvas alimentadas com triptona apresentam alterações em genes do metabolismo de carboidratos	62
Figura 23 –	Larvas alimentadas com triptona não apresentam alterações na atividade enzimática da ATP-citrato liase	63
Figura 24 –	Larvas alimentadas com dieta rica em lipídeo apresentam níveis de carboidrato total e glicogênio aumentados em comparação as larvas controle	64
Figura 25 –	Larvas alimentadas com dieta rica em proteína apresentam uma diminuição nos níveis de carboidratos quando comparadas com larvas de dietas controle	65
Figura 26 –	Perfil transcriptômico de larvas high-fat diet: PCA, DEGs e <i>Volcano plot</i>	67
Figura 27 –	Gráfico de subcategorias de processos biológicos da <i>Gene Ontology</i> .	68
Figura 28 –	Gráfico de subcategorias de componentes celulares da <i>Gene Ontology</i> .	69
Figura 29 –	Gráfico de subcategorias de funções moleculares da <i>Gene Ontology</i> ...	70
Figura 30 –	Gráfico de subcategorias de classes de proteínas da <i>Gene Ontology</i>	71
Figura 31 –	Representação esquemática dos principais efeitos causados pela dieta hiperlipídica e possíveis respostas metabólicas em escala sistêmica.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Projeções do número de indivíduos adultos obesos e o impacto econômico nas Américas do Norte, Central e do Sul entre 2020-2035.....	19
Tabela 2 –	Informação nutricional das dietas utilizadas.....	42
Tabela 3 –	Sequência de primers e concentrações utilizados para qPCR.....	48
Tabela 4 –	Informações obtidas a partir das curvas de calibração dos primers para genes envolvidos no metabolismo lipídico.....	50
Tabela 5 –	ID e nome dos genes destacados no <i>Volcano plot</i>	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACLY	ATP-citrato liase
AKH	Hormônio adipocinético
AKHR	Receptor do hormônio adipocinético
AKT	Proteína kinase B
ATGL	Lipase triglicéridica adiposa
ATP	Adenosina trifosfato
<i>Bmm</i>	Lipase <i>brummer</i>
BSA	Albumina bovina sérica
CACT	Carnitina-acilcarnitina translocase
CARs	Carnitinas
cDNA	DNA complementar
CPT-1	Carnitina palmitoiltransferase 1
CPT-2	Carnitina palmitoiltransferase 2
DAG	Diacilglicerol
DEGs	Genes diferencialmente expressos
DEPC	Pirocarbonato de dietila
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EP	Erro Padrão
FABPs	Proteína de ligação a ácidos graxos
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
FASN	Ácido graxo sintase
FAT	Translocase de ácidos graxos
FATPs	Proteínas transportadoras de ácidos graxos
FC	<i>Fold change</i>
<i>foxO</i>	<i>Forkhead box O</i>
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase

GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GLP-1	Peptídeo similar ao glucagon 1
GO	<i>Gene ontology</i>
HCl	Ácido clorídrico
HFD	<i>High-fat diet</i>
HPD	<i>High-protein diet</i>
HSD	<i>High-sugar diet</i>
HSL	Lipase hormônio sensível
IGF-1	<i>Insulin-growth factor 1</i>
IL-6	Interleucina 6
ILPs	Peptídeos semelhantes à insulina
IMC	Índice de massa corporal
InR	Receptor de insulina
LAL	Lipase ácida lisossomal
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
Lp	Lipoforina
MAG	Monoacilglicerol
MAGL	Monoacilglicerol lipase
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Análise de Componentes Principais
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PKB	Proteína quinase B
POMC	Pró-opiomelanocortina
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência

RPM	Rotações por minuto
SCA	Solução cuproalcalina
SREBP	Proteína ligadora de elemento responsivo a esterol
TAG	Triacilglicerol
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Vg	Vitelogenina
VST	Transformação de estabilização de variância

LISTA DE SÍMBOLOS

“	Aspas
%	Porcentagem
*	Asterisco
,	Vírgula
:	Dois pontos
<	Menor que
=	Igual
±	Mais ou menos
≥	Maior ou igual a
—	Travessão
g	Gramas
kg/m ²	Quilogramas por metro quadrado
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Millimolar
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
°C	Celsius
V	Volts
β	Beta
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	40
1.1	Objetivo geral	40
1.2	Objetivos específicos	40
2	MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1	<i>Tribolium castaneum</i> , a colônia	41
2.2	Montagem de dietas hipercalóricas	41
2.3	Quantificação de proteína total	42
2.4	Quantificação de triacilglicerol (TAG)	43
2.5	Quantificação de carboidrato total, trealose e glicogênio	44
2.5.1	<u>Preparação das amostras</u>	44
2.5.2	<u>Determinação de carboidrato total</u>	44
2.5.3	<u>Determinação de trealose</u>	45
2.5.4	<u>Determinação de glicogênio</u>	45
2.6	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo e transcriptoma	46
2.6.1	<u>Extração de RNA total</u>	46
2.6.2	<u>Dosagem de RNA</u>	47
2.6.3	<u>Remoção de contaminação por DNA genômico</u>	47
2.6.4	<u>Síntese da primeira fita de DNA complementar</u>	47
2.6.5	<u>PCR em tempo real</u>	48
2.6.6	<u>RNAseq</u>	50
2.7	Atividade enzimática da ATP-citrato liase (ACLY)	51
2.8	Desenvolvimento larval	51
2.9	Análise estatística	51
3	RESULTADOS	53
3.1	Acúmulo de triacilglicerol mediado por dietas hipercalóricas e desenvolvimento	53
3.1.1	<u>Dietas ricas em carboidratos não alteram a quantidade de TAG das larvas</u>	53
3.1.2	<u>Dieta rica em proteína não altera a quantidade de TAG das larvas</u>	54
3.1.3	<u>Dietas ricas em lipídeo aumentam o TAG e atrasam o desenvolvimento larval</u>	55

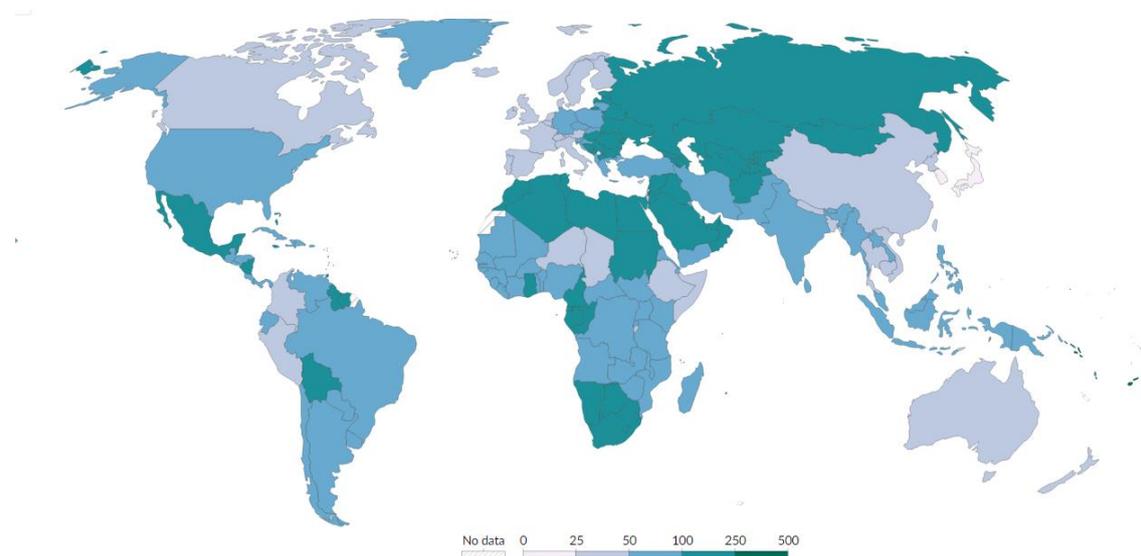
3.2	Perfil de expressão gênica de genes do metabolismo de lipídeos, carboidratos e sinalização endócrina	58
3.3	A atividade da ATP-citrato liase em larvas de alimentação hiperproteica	62
3.4	As quantidades de carboidratos totais e glicogênio de larvas são modificadas por dietas hipercalóricas	63
3.5	Perfil transcriptômico de larvas HFD	65
3.5.1	<i>Gene Ontology</i>	67
4	DISCUSSÃO	72
	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO

Obesidade

A obesidade é descrita sucintamente como um distúrbio metabólico caracterizado por um desequilíbrio na ingestão e no gasto energético, levando a um acúmulo excessivo de lipídeo sob o tecido adiposo. Devido ao seu aumento exponencial, a Organização Mundial da Saúde (OMS) já declarou tal condição como uma pandemia que está se agravando cada vez mais. Atualmente, o índice de massa corporal (IMC) é amplamente utilizado como o método principal para definir sobrepeso e obesidade. De acordo com esse índice, um indivíduo é considerado com sobrepeso quando seu IMC varia de 25,9 kg/m² a 29,9 kg/m², enquanto acima de 30 kg/m² é classificado como obeso. Já são mais de 2 bilhões o número de pessoas, no mínimo, com sobrepeso ao redor do mundo. (JIANG *et al.*, 2016). A Figura 1 demonstra a taxa de mortalidade por obesidade ao redor do mundo levantada em 2019.

Figura 1 – Taxa de mortalidade por obesidade ao redor do mundo, em 2019.

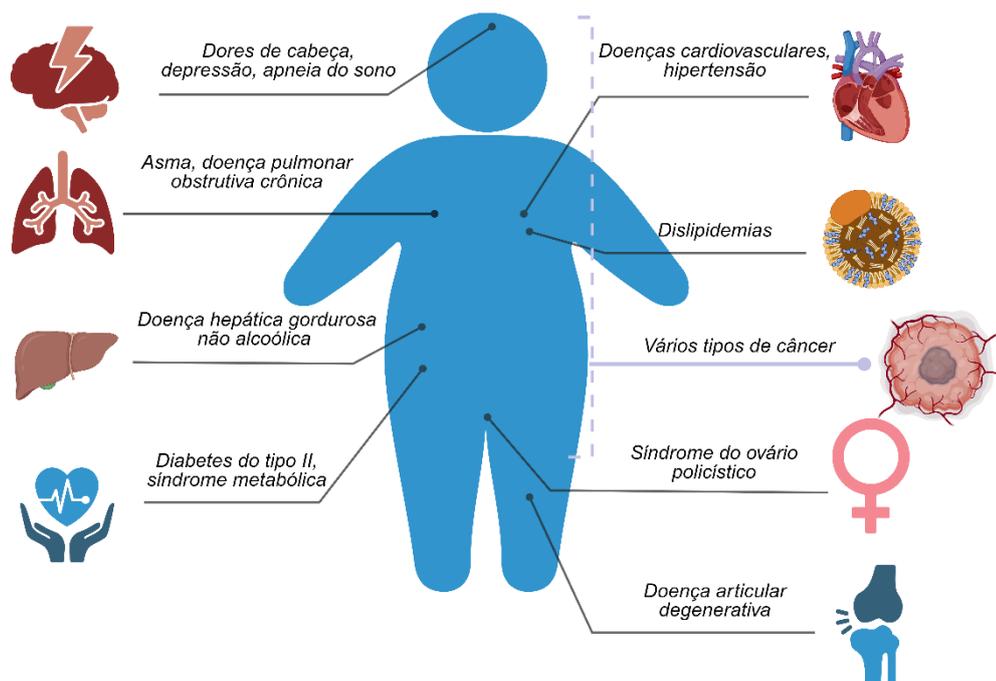


- Legenda: A incidência da mortalidade se dá pela cor. Quanto mais escura a coloração do país, maior a mortalidade. Número anual estimado de mortes atribuídas à obesidade por 100.000 pessoas.
- Nota: Para permitir comparações entre países e ao longo do tempo, a métrica é padronizada por idade. A obesidade é definida como ter um índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m². O IMC é o peso da pessoa (em quilogramas) dividido pela altura (em metros) ao quadrado.
- Fonte: IHME, Global Burden Disease (2019); ourworldindata.org/obesity

Apesar de ser amplamente utilizado para categorizar pacientes e educá-los sobre o risco de desenvolver doenças crônicas e mortalidade, o IMC apresenta algumas falhas. Por não fornecer uma medida direta do percentual de lipídeo corporal, essa métrica pode simplesmente classificar atletas ou indivíduos com massa muscular acima do comum como obesos. Além disso, não leva em consideração a idade, a etnia e o gênero. Uma solução proposta para essa limitação seria a medição da circunferência abdominal aplicada em conjunto com o IMC, visando assegurar uma maior eficácia na avaliação da condição de saúde dos indivíduos (PICHÉ *et al.*, 2020).

A obesidade é uma doença multifatorial, ou seja, são diversos os fatores que podem levar ao seu desenvolvimento: interações entre *status* socioeconômico e fatores ambientais podem acarretar em modificações epigenéticas (VECCHIÉ *et al.*, 2018), mudanças nos hábitos alimentares, o sedentarismo provocado pelo mundo moderno e a tecnologia, e a predisposição genética são alguns deles. Além disso, outra preocupação acerca do avanço da obesidade é o fato de outras complicações não comunicáveis estarem associadas a essa doença, dentre elas a diabetes tipo II, doenças cardiovasculares, dislipidemias, hipertensão e depressão como descrito na Figura 2; além de ser um fator de risco para desenvolvimento grave de COVID-19 (WATANABE *et al.*, 2021).

Figura 2 – Comorbidades que estão associadas à obesidade.



No Brasil, dados estatísticos apontam o avanço crescente da obesidade e déficits alarmantes para os cofres públicos para tratar dessa doença e seus agravos, caso não haja nenhum tipo de intervenção até 2050 (RTVELADZE *et al.*, 2013). Registrando um aumento epidemiológico de quase 6% de 2013 para 2019 no número de pessoas acima do peso ideal, percebe-se que as intervenções de políticas públicas de alimentação e nutrição falharam em conter esse avanço (WATANABE *et al.*, 2022).

Tabela 1 – Projeções do número de indivíduos adultos obesos e o impacto econômico nas Américas do Norte, Central e do Sul entre 2020-2035.

	2020	2025	2030	2035
Número de homens com obesidade (milhões)	111	134	160	187
Número de mulheres com obesidade (milhões)	135	158	183	208
Impacto econômico de IMC alto (IMC \geq 25kg/m²), em bilhões de dólares (valor de 2019)	US\$870	US\$1,030	US\$1,230	US\$1,470

Fonte: adaptado de *Worlds Obesity Atlas*, 2023.

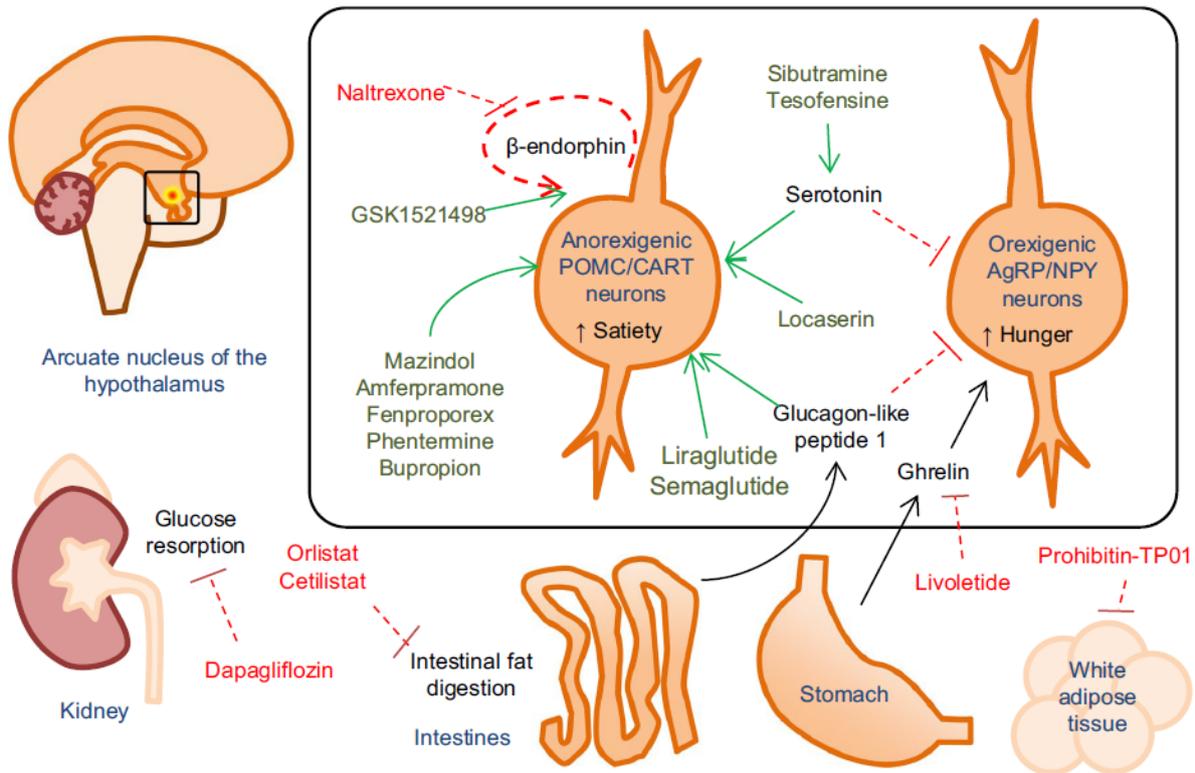
O consumo de alimentos ultraprocessados, *fast food*, álcool e carboidratos simples são fortes contribuidores para a incidência da obesidade no Brasil (WATANABE *et al.*, 2022). Tributar alimentos ricos em lipídeos saturados seria uma abordagem para frear esse distúrbio e promover uma alimentação menos obesogênica e mais saudável, rica em legumes, vegetais e fibras (BURLANDY *et al.*, 2021).

Diversos métodos podem ser empregados para combater a obesidade: cirurgia bariátrica, a utilização de fármacos e, até mesmo, consultas em grupo. No entanto, mesmo que todas essas alternativas pudessem ser adotadas por toda a população, elas ainda não agiriam diretamente sobre os fatores causais da doença. Além disso, a busca pelo tratamento de forma individual por parte das pessoas obesas é baixa, porque o ambiente obesogênico as pressiona, impedindo que a motivação pessoal seja capaz de ajudá-las a mudar seus hábitos alimentares (WATANABE *et al.*, 2022).

Atualmente, a farmacoterapia tem sido amplamente utilizada para combater a obesidade. No entanto, o uso de fármacos, como a sibutramina e a liraglutida, apresenta algumas desvantagens consideráveis. A sibutramina funciona como um inibidor da recaptação de serotonina, que leva ao aumento desse neurotransmissor nas fendas sinápticas. O aumento de serotonina ativa os neurônios anorexígenos POMC e inibe os orexigênicos neuropeptídeo Y (NPY), o que resulta na redução do apetite e aumento do gasto energético. Apesar de haver uma redução de peso considerável, estudos apontaram um aumento da pressão arterial em indivíduos obesos tratados com o medicamento. A liraglutida, por sua vez, é responsável por induzir sensação de saciedade ao se ligar aos receptores do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1; hormônio sintetizado no trato gastrointestinal), que estão presentes nos neurônios que expressam POMC. Inicialmente, esse medicamento foi produzido para tratar diabetes do tipo II, mas o mecanismo de ação promove a diminuição no consumo de alimentos, resultando na perda de peso. Mesmo com seus efeitos benéficos, sua forma injetável e o preço do tratamento diminuem a gama de pacientes obesos que podem optar pelo seu uso (ROSA-GONÇALVES E MAJEROWICZ, 2019).

Mais recentemente, a semaglutida tem se tornado cada vez mais popular entre a população que deseja perder peso. Assim como a liraglutida, inicialmente esse medicamento foi idealizado para tratar pacientes diabéticos, porém seu potencializador efeito de perda de peso não acompanhado de náuseas e/ou aversão à alimentação está atraindo os olhares de diversos grupos. A sensação de saciedade acompanhada de uma diminuição na ingestão energética durante as refeições e a menor preferência por alimentos ricos em lipídeos torna esse medicamento uma boa opção para a população diabética. Contudo, como todo medicamento, a semaglutida também está acompanhada de efeitos colaterais de forma dose-dependente que englobam problemas gastrointestinais, hipoglicemia, nasofaringite e dores de cabeça. Alguns autores destacam que o seu uso está ligado a um risco de desenvolvimento de câncer de tireoide, pancreatite e outros, porém estes ainda não foram confirmados em humanos. Além disso, por ser um fármaco recente, muitos riscos de seu uso ainda não foram confirmados pela comunidade científica, necessitando um maior cuidado ao utilizá-lo como forma de emagrecimento (SABBÁ *et al.*, 2022). A Figura 3 ilustra os mecanismos de ação de alguns fármacos utilizados para tratar a obesidade.

Figura 3 – Mecanismo de ação de fármacos no tratamento da obesidade



Legenda: *Arcuate nucleus of the hypothalamus* – núcleo arqueado do hipotálamo; *Kidney* – rins; *Stomach* – estômago; *Glucose resorption* – reabsorção de glicose; *Intestinal fat digestion* – digestão intestinal de lipídeo; *White adipose tissue* – tecido adiposo branco; *Ghrelin* – grelina; *Serotonin* – serotonina; *Anorexigenic POMC/CART neurons* – neurônios anorexigênicos POMC/CART; *Orexigenic AgRP/NPY neurons* – neurônios orexigênicos; *Glucagon-like peptide 1* – peptídeo similar ao glucagon 1; *Hunger* – fome; *Satiety* – saciedade;

Fonte: Current and investigational anti-obesity drugs help reduce weight and offer additional benefits, but more effective options are needed. *DRUGS Ther Perspect* 2020; 36: 12–16. doi:10.1007/s40267-019-00679-9 WE - Emerging Sources Citation Index (ESCI).

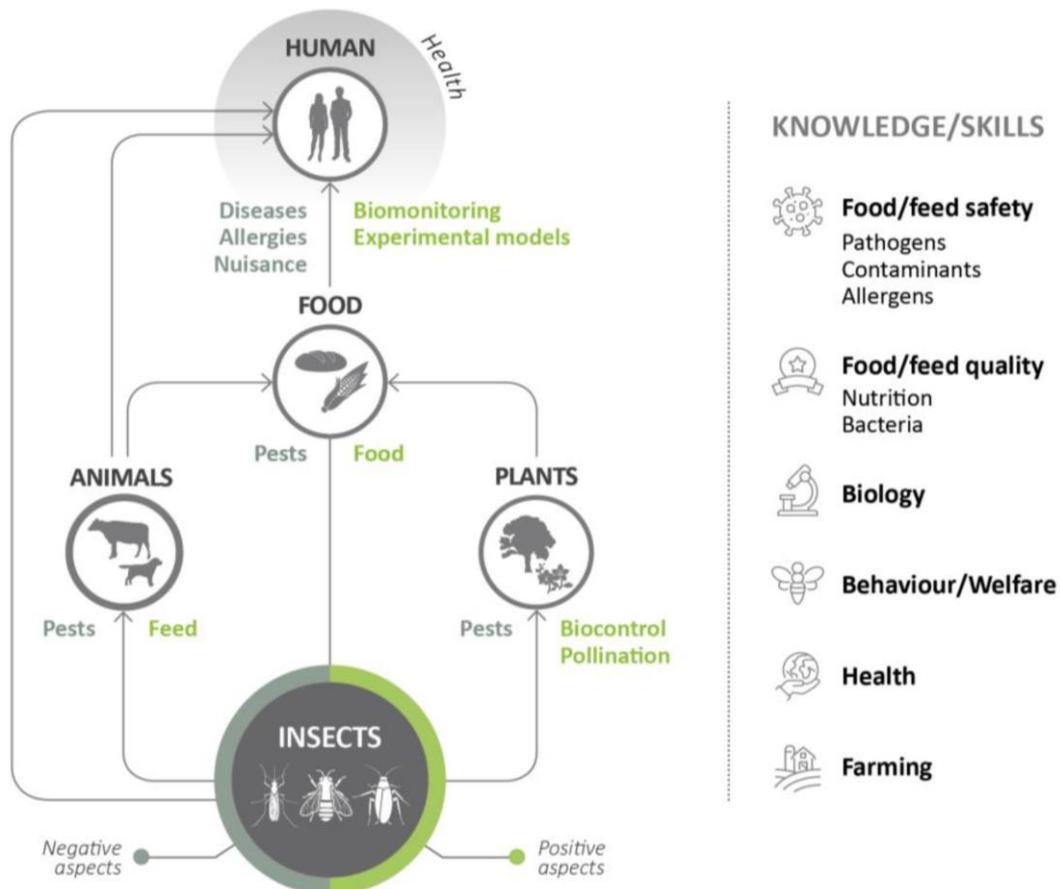
Com isso, torna-se necessária a busca por novos modelos que possibilitem o estudo de doenças metabólicas, como a obesidade e suas complicações. Dito isso, os insetos se apresentam como animais multicelulares menos complexos que mamíferos e capazes de atender a essa demanda no meio científico (WALKOWIAK-NOWICKA *et al.*, 2021).

Insetos

Os insetos representam a maior diversidade animal no planeta, com quase 2 milhões de espécies já nomeadas. Eles desempenham várias funções nos ecossistemas em que vivem, atuando como polinizadores, agentes de controle populacional ao parasitar e predação outros

organismos, sendo vetores de doenças e alguns sendo considerados pragas agrícolas por contaminarem alimentos estocados e plantas. Contudo, também apresentam relações benéficas com os seres humanos como ilustrado na Figura 3; as abelhas, por exemplo, são bastante exploradas para produção de mel (BELLUCO *et al.*, 2023). Graças à conquista de diversos nichos ecológicos e por estarem suscetíveis ao contato com vários patógenos, os insetos têm atraído a atenção de pesquisadores para explorar os mecanismos envolvidos em processos metabólicos (CHOWANSKI *et al.*, 2017).

Figura 4 – Relacionamentos positivos (verde) e negativos (cinza) entre insetos em relação a contextos com implicação para saúde pública.

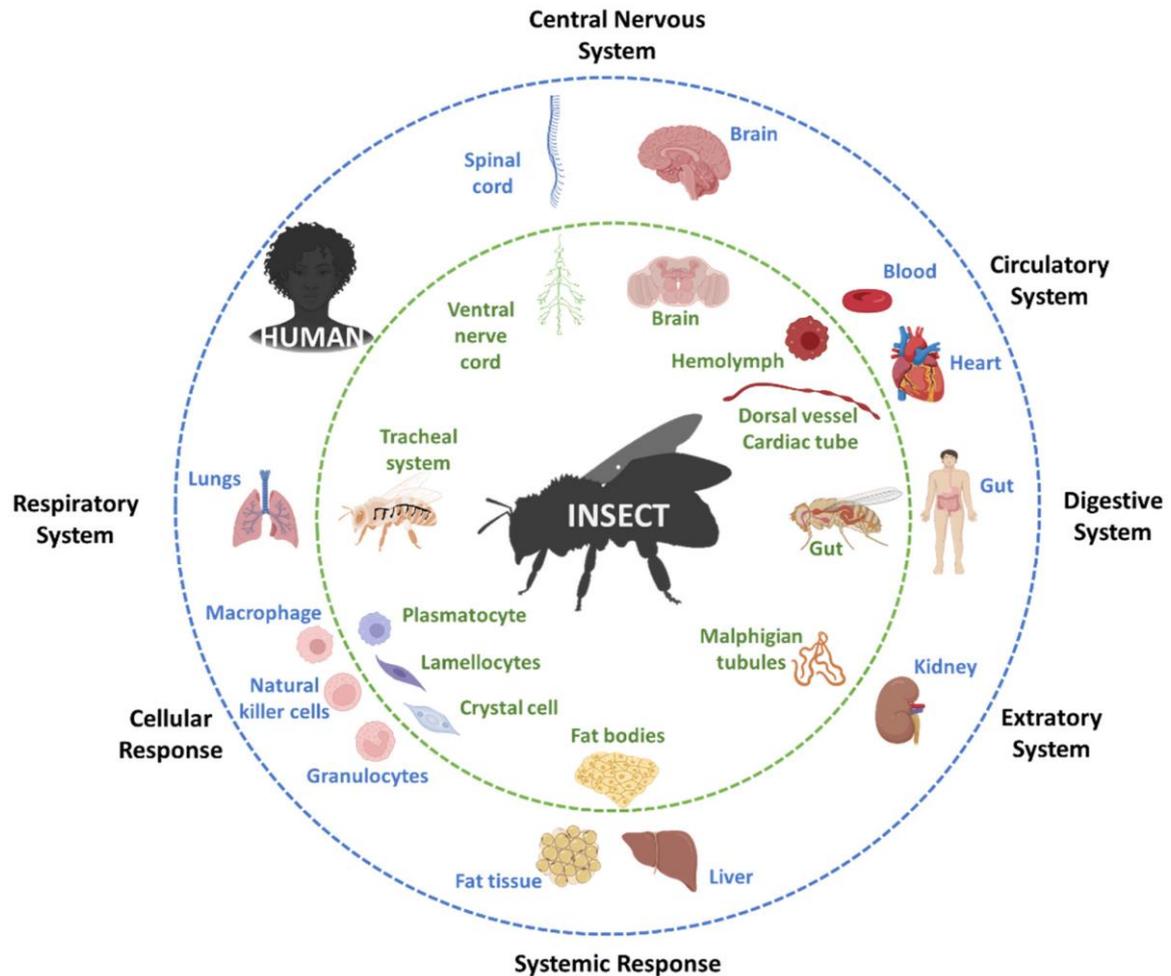


Fonte: Belluco *et al.*, 2023.

Apesar dos mamíferos serem muito mais próximos dos humanos evolutivamente, a exploração destes animais em laboratórios apresenta restrições e éticas pré-definidas (FAGUNDES E TAHA, 2004). Contudo, tais regras não se aplicam aos insetos; eles são comumente utilizados em pesquisas laboratoriais nas áreas da genética e de desenvolvimento,

mas também estão sendo considerados para pesquisas médicas e nutricionais devido a alguns mecanismos similares aos mamíferos (TONK-RÜGEN *et al.*, 2022).

Figura 5 –Sistemas biológicos conservados em humanos e insetos.



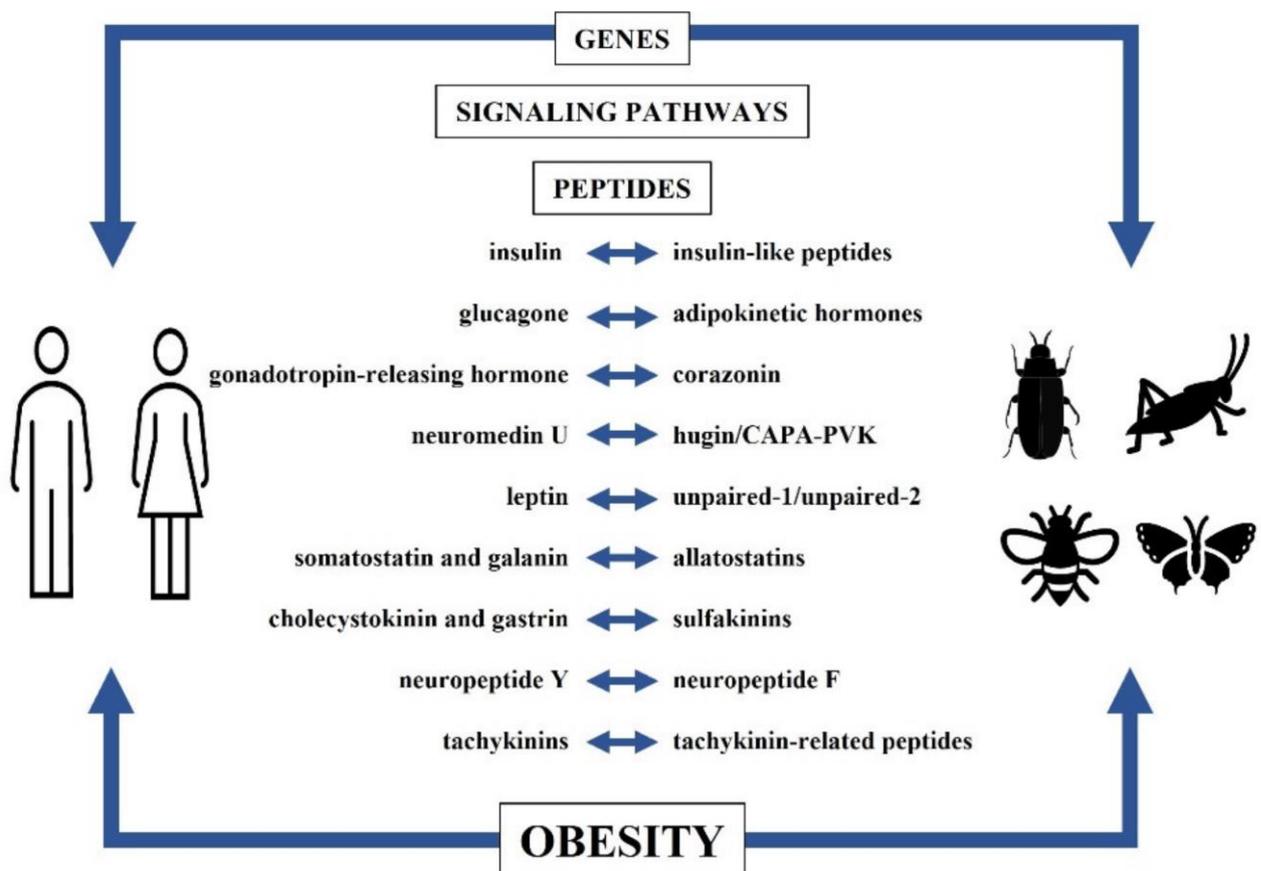
Legenda: *Central Nervous System* – Sistema Nervoso Central; *Brain* – cérebro; *Spinal cord* – medula espinhal; *Human* – humano; *Ventral nerve cord* – cordão nervoso central; *Circulatory system* – sistema circulatório; *Blood* – sangue; *Heart* – coração; *Hemolymph* – hemolinfa; *Dorsal vessel* – vaso dorsal; *Cardiac tube* – tubo cardíaco; *Digestive system* – sistema digestivo; *Gut* – intestino; *Extratory system* – sistema excretor; *Kidney* – rim; *Malpighian tubules* – túbulos de Malpighi; *Systemic response* – resposta sistêmica; *Fat tissue* – tecido adiposo; *Liver* – fígado; *Fat bodies* – corpo gorduroso; *Cellular response* – resposta celular; *Granulocytes* – granulócitos; *Natural killer cells* – células NK; *Macrophage* – macrófago; *Crystal cell* – célula cristalina; *Lamellocytes* – lamelócitos; *Plasmatocyte* – plasmócito; *Respiratory system* – sistema respiratório; *Lungs* – pulmões; *Trachel system* – sistema traqueal.

Fonte: Tonk-Rügen *et al.*, 2022.

Mesmo considerando a distância evolutiva em relação aos mamíferos, esses artrópodes apresentam características que justificam sua utilização no meio acadêmico. Estudos apontam que uma grande porcentagem de infecções patogênicas aplicadas aos mamíferos pode ser

estudada em insetos (RENEWICK E KAVANAGH, 2007), reduzindo assim a quantidade significativa de camundongos que poderiam ser utilizados em experimentos. Além disso, outros atributos conservados evolutivamente em níveis anatômicos, fisiológicos e genéticos também validam a substituição de mamíferos por insetos: homologia entre genes que codificam proteínas responsáveis por vias de sinalização e sistemas biológicos conservados, similaridade entre órgãos — o corpo gorduroso do inseto realiza processos metabólicos equiparáveis ao fígado e ao tecido adiposo de mamíferos (AZEEZ *et al.*, 2014) — um sistema imunológico inato evolutivamente conservado (TONK-RÜGEN *et al.*, 2022) e hormônios reguladores de carboidrato na hemolinfa que se assemelham à insulina e ao glucagon dos humanos: peptídeo similar à insulina (ILPs) e hormônio adipocinético (AKH), respectivamente (WALKOWIAK-NOWICKA *et al.*, 2021). A Figura 6 destaca os principais peptídeos relacionados com a obesidade em comum entre humanos e insetos.

Figura 6 - Similaridades entre os fatores humanos e dos insetos correlacionados com a obesidade.



Legenda: *Signaling pathways* – vias de sinalização; *Peptides* – peptídeos; *Insulin* – insulina; *Glucagon* – glucagon; *Gonadotropin-releasing hormone* – hormônio liberador de gonadotrofina; *Neuromedin U* – neuromedina U; *Leptin* – leptina; *Somatostatin and galanin* - somatostatina e galanin; *Neuropeptide Y*

– neuropeptídeo Y; *Tachykinins* – taquicininas; *Insulin-like peptides* – peptídeos similares à insulina; *Adipokinetic hormones* – hormônios adipocinéticos; *Corazonin* – corazonina; *Allatostatins* – alostatatinas; *Sulfakinins* – sulfacinas; *Neuropeptide F* – neuropeptídeo F; *Tachykinin-related peptides* – peptídeos relacionados à taquicininas.

Fonte: Walkowiak-Nowicka *et al.*, 2021.

Um dos insetos mais utilizados para pesquisa voltada à obesidade e suas doenças correlacionadas é a *Drosophila melanogaster*, também conhecida como mosca-da-fruta. Dados indicam que essa mosca é capaz de desenvolver obesidade e condições agravantes quando exposta a uma dieta com grande quantidade de calorias, assemelhando-se à forma como os humanos também se tornam obesos (MUSSELMAN E KÜHNLEIN, 2018). Além disso, também é descrito que genes que desempenham funções em doenças metabólicas são conservados evolutivamente entre humanos e insetos (REITER *et al.*, 2001).

Enquanto nos Estados Unidos a *D. melanogaster* é amplamente explorada como modelo animal pela comunidade científica, com diversos artigos já publicados, menos de 1% dos projetos a utilizam como objeto principal de estudo no Brasil, e a grande maioria dos que trabalham focam em áreas ecológicas e evolutivas. Especula-se que essa baixa adesão se deve à informação enganosa de que são necessários equipamentos caros e especializados para realizar experimentos com insetos na área acadêmica (GARCIA *et al.*, 2021).

No entanto, estudar somente a *D. melanogaster* não é suficiente para compreendermos todos os processos metabólicos, de modo que são necessários outros modelos de insetos a fim aumentar a diversidade de alvos genéticos. Dito isso, este projeto propõe a utilização de um novo modelo experimental para o estudo de doenças metabólicas: o *Tribolium castaneum*. Entre os coleópteros, ordem mais diversa dentre os eucarióticos, este besouro é o animal que apresenta o genoma mais bem sequenciado e anotado, além de possuir dados transcriptômicos e responder bem à técnica de RNA de interferência (RNAi) (RÖSNER *et al.*, 2020). Explorar esse animal como modelo permite uma ampliação do escopo genético de insetos para além dos genes candidatos da *D. melanogaster* (POINTER *et al.*, 2021).

Tribolium castaneum

O *T. castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), é popularmente conhecido como "besouro vermelho da farinha" (*red flour beetle*). Esse nome popular se deve à sua coloração castanho-

avermelhada e ao fato de ser uma praga agrícola global de grãos armazenados, como soja e milho, causando prejuízos econômicos consideráveis. O estabelecimento desse besouro como modelo teve início na década de 1920, quando sua utilização era aplicada principalmente na genética de populações (KUMAR *et al.*, 2018). Atualmente, o besouro também é explorado em áreas como parasitologia, ecoimunologia e ecologia evolutiva de doenças infecciosas (POINTER *et al.*, 2021).

Diversos motivos validam a utilização do *T. castaneum* como modelo animal para doenças metabólicas. Esse besouro foi o primeiro coleóptero a ter seu genoma completamente sequenciado (RICHARDS *et al.*, 2008) e novas atualizações continuam a sair na literatura (HERNDON *et al.*, 2020). Em complemento a isso, esse besouro ainda possui um banco de dados contendo diversas informações que incluem sequências, genes, mutações e publicações denominado *BeetleBase* (WANG *et al.*, 2007).

O estabelecimento e cultivo da colônia do besouro em laboratório é extremamente simples, pois o ambiente do animal é também o seu meio alimentar, geralmente sendo a farinha de trigo. Uma vantagem dos besouros é que o que for misturado ao seu alimento padrão será ingerido por eles de forma eficaz, permitindo que as interações entre alimentos e genes sejam estudadas (GRÜNWALD *et al.*, 2013). As condições ideais para o desenvolvimento da colônia compreendem uma temperatura aproximadamente de 30 °C (POINTER *et al.*, 2021) e uma umidade relativa do ar de 70 %. O besouro apresenta uma alta resistência a ambientes quentes, áridos e secos, e isso se deve ao fato dos túbulos de Malpighi estarem inseridos no reto do animal e permitirem a reabsorção quase que completa da água (FREIRE, 2018).

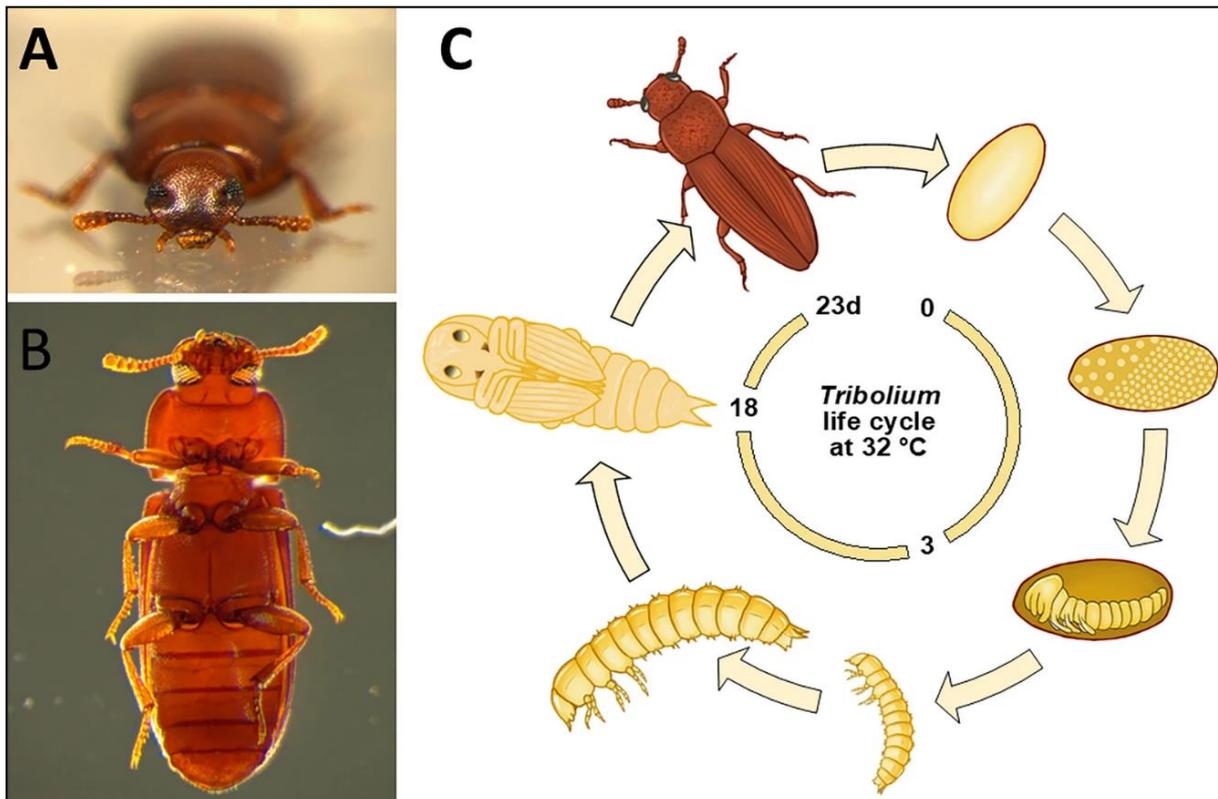
O ciclo de vida do *T. castaneum* é consideravelmente curto, onde 30 dias são necessários para atingir a fase adulta. Além de apresentar uma alta taxa de reprodução, a fêmea é capaz de ovipositar entre 200 a 500 ovos durante todo o seu ciclo biológico, o que permite visualizar uma resposta mais rápida de efeitos genéticos e metabólicos nos seus descendentes do que em camundongos (KUMAR *et al.*, 2018).

A metamorfose do *T. castaneum* é completa, ou seja, é um inseto holometábolo (FREIRE, 2008). O ovo eclode três dias após a oviposição. A fase larval apresenta de seis a oito estágios larvais e dura cerca de 20 dias, a mais longa entre todas as fases. A fase pupal dura quatro dias, e dela emerge o besouro adulto. O animal adulto é pequeno, cerca de 4mm, e possui uma coloração escura. O dimorfismo sexual está presente da pupa em diante (POINTER *et al.*, 2021). A Figura 7 ilustra todo o ciclo de vida do animal, bem como diferentes ângulos do mesmo.

Além de diferir da *D. melanogaster* no que diz respeito ao voo — o que permite um estabelecimento mais fácil em laboratório (POINTER *et al.*, 2021) — as homologias genéticas entre o *T. castaneum* e humanos são maiores (GRÜNWALD *et al.*, 2013), apresentando cerca de 126 grupos de genes ortólogos (RICHARDS *et al.*, 2008).

Muito se sabe sobre o *T. castaneum* como modelo para estudo genético e resistência a pesticidas, mas pouca informação está descrita na literatura sobre suas respostas metabólicas; principalmente no que se diz respeito ao seu metabolismo de lipídeos. Além disso, é importante salientar que esse animal é considerado uma praga que afeta grãos globalmente; logo, todo conhecimento científico obtido de experimentos com o mesmo pode servir para aumentar a segurança desses alimentos que são estocados (EL-AZIZ, 2011).

Figura 7 – Ciclo de vida do *Tribolium castaneum*.



Legenda: (A) Visão frontal do *T. castaneum* selvagem. (B) Visão ventral de um macho em uma iluminação escura.
(C) Ciclo de vida completo do inseto holometábolo.

Fonte: Klingler & Bucher, 2022.

Por fim, vários fatores são vistos como vantagens que contribuem para a utilização do *T. castaneum* como modelo, principalmente para o estudo do seu metabolismo de lipídeos (FREIRE, 2018). Dito isso, esse projeto se propõe a estabelecer o besouro como um modelo

experimental para estudo de doenças metabólicas sendo desafiado por dietas hipercalóricas, investigando seu metabolismo de lipídeos.

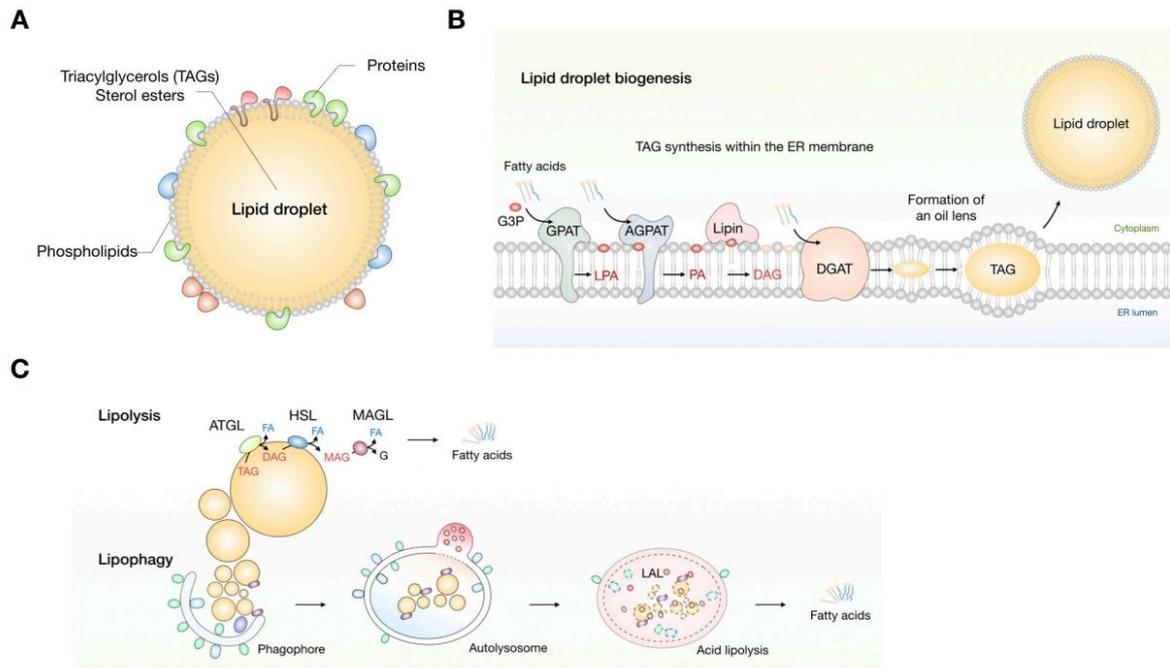
Metabolismo de lipídeos em insetos

Os lipídeos, além dos carboidratos e proteínas, são moléculas essenciais para o metabolismo energético. No entanto, se tratando dos insetos, eles também são importantes para o crescimento, desenvolvimento, voo de longa duração e diapausa. Feromônios sexuais, cera cuticular e secreções defensivas também são sintetizados a partir de lipídeos (TOPRAK, 2020). Essas moléculas anfipáticas podem ser encontradas em diversos tecidos dos insetos, como o intestino médio e os ovários; mas o principal local de armazenamento de lipídeos é o corpo gorduroso (TROPÁK *et al.*, 2020).

O corpo gorduroso é o principal centro de processamento do metabolismo lipídico e energético dos insetos. Esse órgão está distribuído pelo corpo inteiro do animal e é composto principalmente por adipócitos. Apesar de ter uma anatomia diferente, ele desempenha funções que se assemelham ao tecido adiposo humano. Dentro dos adipócitos, existem organelas denominadas gotículas lipídicas (TOPRAK *et al.*, 2020). Sua composição principal é triacilglicerol (TAG) e uma monocamada de fosfolipídeos, da mesma forma que os lipídeos são estocados no tecido adiposo dos mamíferos. As perilipinas, proteínas que se associam à superfície das gotículas lipídicas, e as lipases são os principais componentes encontrados nessas organelas e são responsáveis por regular o metabolismo de lipídeos nas células do corpo gorduroso (LI *et al.*, 2019).

A síntese do TAG se dá na membrana do retículo endoplasmático através da adição de ácidos graxos a um esqueleto de glicerol-3-fosfato (G3P). A etapa final é catalisada pela diacilglicerol aciltransferase (DGAT). Já a sua degradação se dá por lipólise ou lipofagia. A lipólise é mediada pela ação da lipase triglicerídea adiposa (ATGL), lipase sensível a hormônio (HSL) e da monoacilglicerol lipase (MAGL). A lipofagia é uma autofagia onde as gotículas de lipídeos são envolvidas por membranas autofágicas e degradadas no lisossomo através da lipase ácida lisossomal (LAL) (JARC E PETAN, 2019).

Figura 8 – Estrutura, síntese e degradação de gotículas de lipídeos.



Legenda: (A) As gotículas de lipídeos são compostas de lipídeos neutros, principalmente TAG e esteróis-éster. Elas são revestidas por uma única camada de fosfolípídeos e por proteínas inseridas nela. (B) Etapas da biogênese das gotículas lipídicas. (C) Degradação das gotículas de lipídeos por lipólise ou lipofagia.

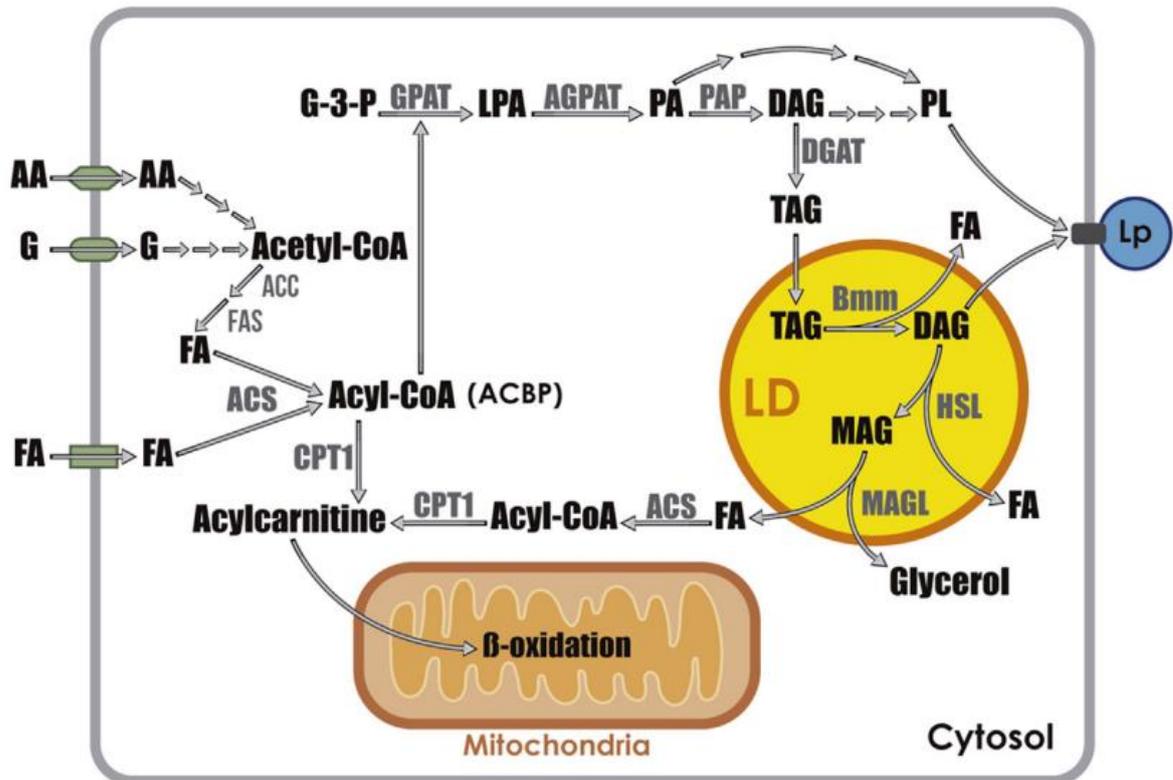
Fonte: Jarc e Petan, 2019.

Além de ser alvo do hormônio juvenil e ecdisona, o corpo gorduroso também produz hormônios que regulam reações metabólicas. Ele está relacionado à circulação de metabólitos intermediários no corpo e à síntese de proteínas que vão para a hemolinfa. Enquanto a vitelogenina (Vg) está relacionada à maturação de ovos e garante que eles recebam nutrientes, a lipoforina (Lp) é responsável por transportar lipídeos na forma de diacilglicerol (DAG) pela hemolinfa e desta para outros órgãos que possam necessitar deles (ARRESE; SOULAGES, 2010). As moléculas produzidas pelo corpo gorduroso são transportadas para os órgãos-alvos através da hemolinfa, assim como todos os nutrientes transportados do intestino médio para o corpo gorduroso também são realizados através dela. Portanto, essa interação corpo gorduroso-hemolinfa é a chave principal para que o metabolismo energético atenda às demandas biológicas do animal (TOPRAK *et al.*, 2020).

Dois métodos descritos na literatura explicam como os insetos digerem o TAG proveniente da dieta. Apesar de ambos envolverem a hidrólise do triacilglicerol, os produtos gerados nas reações são diferentes. Em 1979, demonstrou-se que a hidrólise do triacilglicerol gera monoacilgliceróis (MAG) e ácidos graxos (HOFFMAN & DOWNER, 1979). Já em 1988, também se comprovou que a hidrólise completa do TAG gera ácidos graxos e glicerol

(TSUCHIDA & WELLS, 1988). Ao sofrer hidrólise na presença da TAG-lipase (TGL), os ácidos graxos resultantes são absorvidos pelas células do intestino médio, enquanto os fosfolípidos são incorporados pelos enterócitos, células epiteliais do intestino (GONDIM *et al.*, 2018).

Figura 9 – Metabolismo de lipídeos em inseto a nível celular.



Legenda: AA – aminoácido incorporado; G – glicose. ACC – Acetil-CoA Carboxilase; FAS – ácido graxo sintase; ACS – Acil-CoA sintetase; CPT1 – carnitina palmitoiltransferase 1; G3P – glicerol-3-fosfato; GPAT – glicerol-3-fosfato aciltransferase; LPA – ácido lisofosfatídico; AGPAT – 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase; PA – ácido fosfatídico; PAP – fosfatidato fosfohidrolase; DAG – diacilglicerol; DGAT – diacilglicerol aciltransferase; TAG – triacilglicerol; Bmm – Lipase Brummer; DAG – diacilglicerol; HSL – lipase sensível a hormônio; MAG – monoacilglicerol; MAGL – monoacilglicerol lipase; FA – ácido graxo.

Fonte: Gondim *et al.*, 2018.

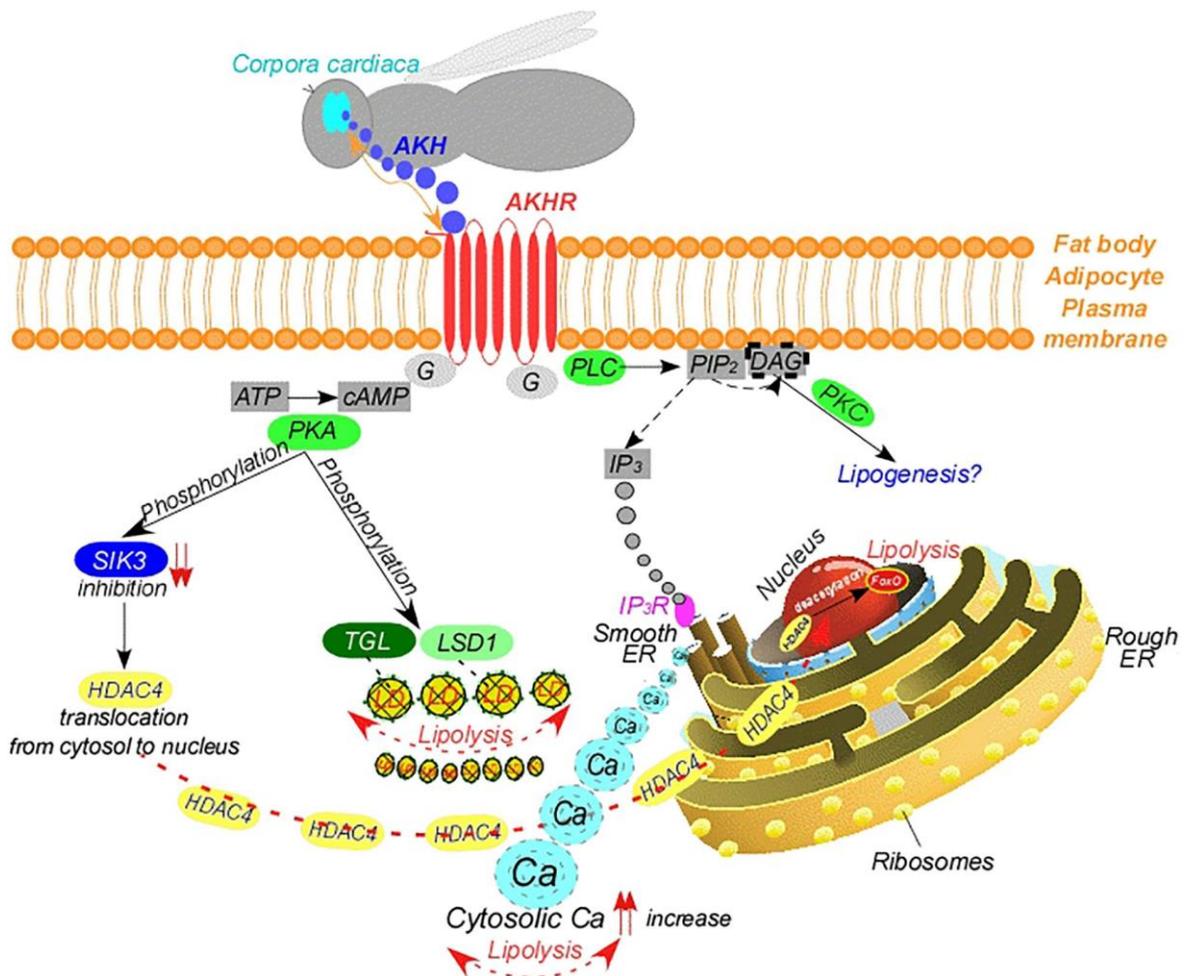
Hormônios peptídicos no metabolismo lipídico

Dois hormônios peptídicos importantes envolvidos no metabolismo de lipídeos dos insetos são o **hormônio adipocinético (AKH)** e os **peptídeos similares à insulina (ILPs)**, análogos ao glucagon e à insulina humanos, respectivamente.

A produção de AKH ocorre por células neurosecretoras localizadas na *corpora cardiaca*, no tórax, e sua função principal está relacionada à mobilização de lipídeos do corpo gorduroso. A lipólise se inicia com a ação do AKH sobre a TGL quando ocorrem mudanças bruscas na necessidade de lipídeos ou quando a lipase *Brummer (Bmm)* - homólogo da ATGL de mamíferos - é acionada para manter os níveis lipídicos no nível metabólico basal (TOPRAK, 2020). Estudos demonstraram que moscas mutantes para *Bmm* apresentam deficiência no transporte de lipídeos e são obesas (GRÖNKE *et al.*, 2005).

Alguns motivos explicam a escolha de analisar a expressão do receptor do hormônio adipocinético nesse projeto: o AKH é produzido somente na *corpora cardiaca* e a dissecação desse órgão é complicada; além disso, seu gene é pequeno e difícil de identificar. Logo, a expressão do receptor é a melhor escolha para averiguar os impactos da dieta no metabolismo do inseto.

Figura 10 – Mecanismo de ação do hormônio adipocinético (AKH).



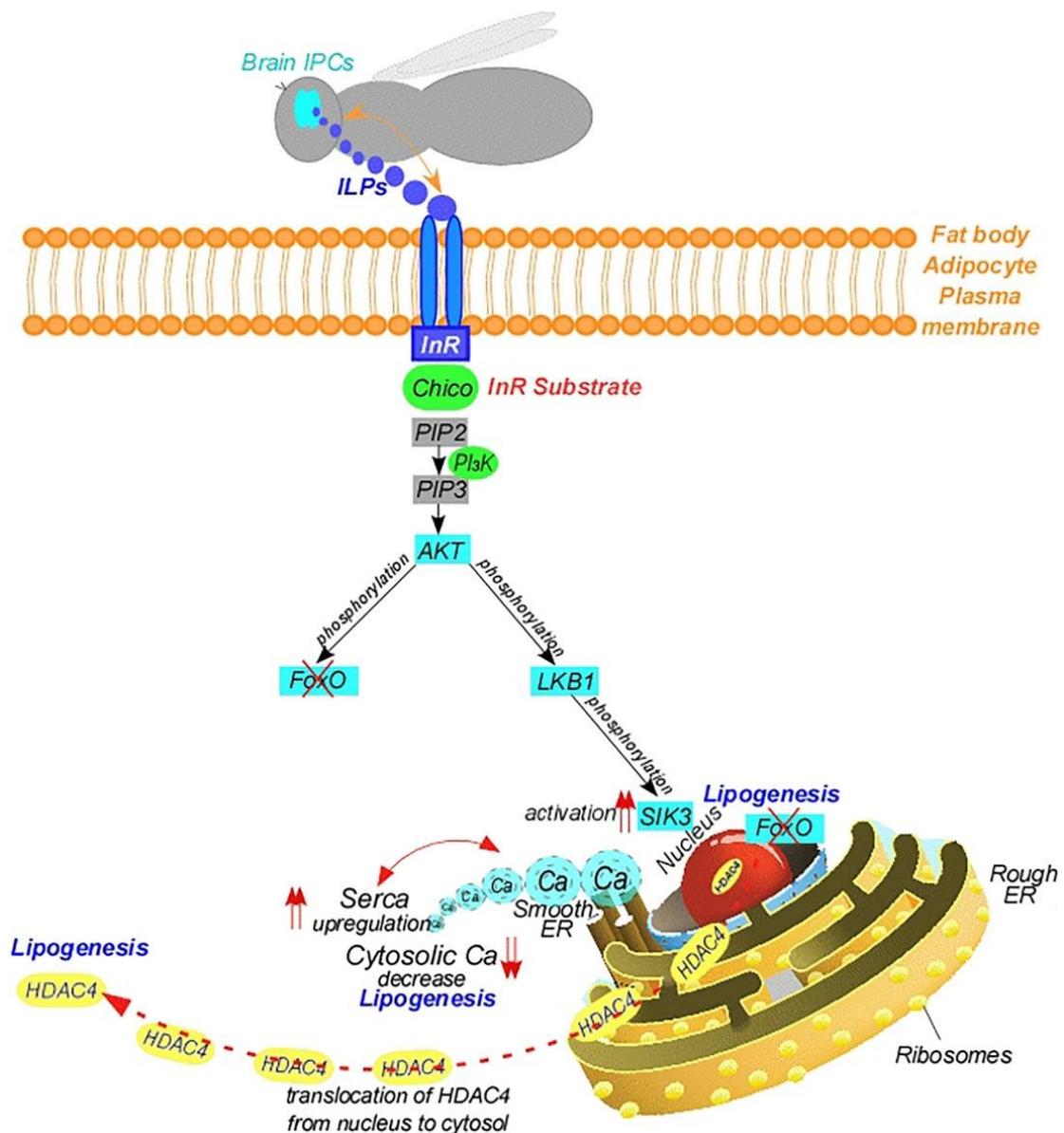
Legenda: AKHR – receptor do hormônio adipocinético; Ca – cálcio; DAG – diacilglicerol; ER – retículo endoplasmático; G – proteína G; HDAC4 – histona deacetilase 4; IP3 – inositol-1,4,5-trifosfato; IP3R – receptor do inositol-1,4,5-trifosfato; LD – gotícula de lipídeos; LSD1 – proteína 1 de gotícula de

lipídeos; PLC – fosfolipase C; PIP2 – fosfatodilinositol 4,5-difosfato; PKA – proteína quinase dependente de AMP cíclico; PKC – proteína quinase dependente de cálcio; SIK3 – quinase 3 induzida por cálcio; TGL – triglicerídeo lipase; Lipolysis – lipólise.

Fonte: TOPRAK, 2020.

As ILPs são responsáveis por regular os níveis de carboidrato circulante na hemolinfa e são elementos-chave no crescimento, reprodução e respostas ao estresse no inseto. Elas são secretadas pelas células produtoras de insulina localizadas no cérebro. Enquanto sua secreção é aumentada pela quantidade de carboidratos, ela diminui durante a fome (TOPRAK, 2020).

Figura 11 – Mecanismo de ação dos peptídeos similares à insulina (ILPs).



Legenda: AKT – proteína serina-treonina quinase; Ca – cálcio; ER – retículo endoplasmático; G – proteína G; HDAC4 – histona diacetilase 4; ILP – peptídeo similar à insulina; InR – receptor de insulina; IPC – células produtoras de insulina; LKB1 – quinase hepática B1; PI3K – fosfoinositídeo-3-quinase classe I; PIP2 – fosfatodilinositol 4,5-difosfato; PIP3 – fosfatodilinositol 3,4,5-trifosfato; SERCA - ATPase de

cálcio do retículo sarcoplasmático/endoplasmático; SIK3 – quinase 3 induzida por cálcio; Lipogenesis – lipogênese;
Fonte: TOPRAK, 2020.

É proposto que a via de sinalização desse hormônio seja conservada em insetos. Durante níveis elevados de nutrientes na hemolinfa, a via é ativada principalmente quando as ILPs se ligam ao receptor de insulina (InR) na membrana da célula. Logo, Chico, que é o substrato desse receptor, é recrutado e ativa a fosfoinositídeo-3-quinase classe I (PI3K). Este último é responsável por catalisar a adição do grupamento fosfato ao fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), formando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). O aumento de PIP3 leva ao recrutamento da proteína quinase B (PKB), também denominada proteína serina-treonina quinase (AKT), à membrana. Através da fosforilação, AKT inibe a atividade da foxO — *forkhead box O* (TOPRAK, 2020). A fosforilação de foxO pela AKT inibe funções transcricionais de foxO e contribui para o crescimento e proliferação celular. Em mamíferos, foxO é um supressor de tumores de vários tipos de câncer (ZHANG *et al.*, 2011). Ao inibir a atividade de foxO, as ILPs ativam a proteína ligadora de elemento responsivo a esterol (SREBP) — um fator de transcrição responsável por regular genes que estão envolvidos na síntese de ácidos graxos *de novo*, acarretando no armazenamento de reservas energéticas como TAG (TOPRAK, 2020).

Síntese de ácidos graxos *de novo*

A lipogênese *de novo* é caracterizada pela síntese endógena de ácidos graxos através de substratos não lipídicos, tais como carboidratos, carboidratos e aminoácidos. A atividade da síntese de ácidos graxos *de novo* aumentada está relacionada com o consumo exagerado de carboidratos e baixa atividade física (IMAMURA *et al.*, 2020). Além disso, em mamíferos, estudos preconizam que níveis elevados de metabólitos dessa via contribuem para a ocorrência de doenças como o câncer, esteatose hepática não alcoólica e diabetes do tipo II (KELLY *et al.*, 2020).

Quando a célula apresenta altos níveis de ATP e Acetil-CoA, ocorre um estímulo à síntese. Isso se dá devido ao fato de que concentrações elevadas de ATP inibem a isocitrato

desidrogenase, bloqueando assim o fluxo do citrato para o Ciclo de Krebs. Esse bloqueio, por sua vez, promove a síntese de lipídeos (NELSON; COX, 2014).

A lipogênese *de novo* é catalisada primordialmente por duas enzimas citosólicas: a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido graxo sintase (FASN). O acetil-CoA é metabolizado em malonil-CoA pela ação da ACC e, posteriormente, esse último é transformado em palmitato pela FASN. Por regular diretamente os níveis de malonil-CoA – que é um regulador alostérico da CPT1 (carnitina palmitoilaciltransferase 1), enzima responsável pelo transporte de ácidos graxos para a mitocôndria para a beta oxidação – a ACC é uma chave crítica de transição entre síntese e beta oxidação de ácidos graxos. Apesar de produzir palmitato na reação final, os produtos iniciais da ação da FAS podem ser alongados ou dessaturados, o que garante uma produção de diversas espécies de ácidos graxos. É necessário um alto nível energético para cada reação de condensação: uma quantidade de ATP significativa, 8 moléculas de acetil-CoA e 2 NADPH. Para sintetizar o palmitato, mais 14 NADPH são necessários. Por ser altamente metabólico e para que ocorra apropriadamente, a síntese *de novo* é regulada por fatores de transcrição, como a SREBP-1 (WALLACE E METALLO, 2020; KELLY *et al.*, 2020).

Apesar de produzir várias espécies de ácidos graxos, o ácido palmítico (16:0) é seu principal produto, sendo assim armazenado como reserva energética sobre a forma de triacilglicerol (IMAMURA *et al.*, 2020).

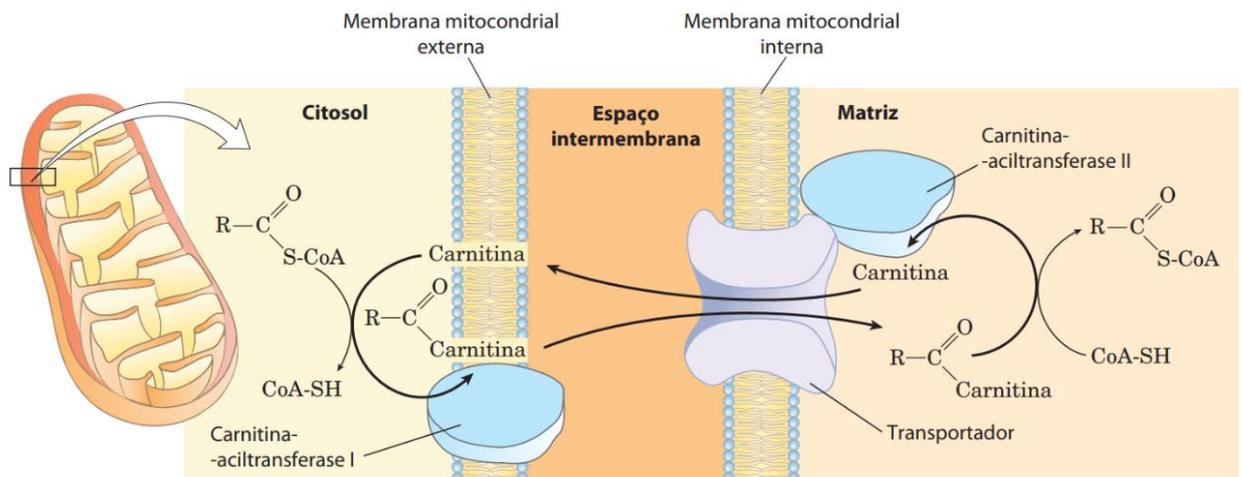
β -oxidação de ácidos graxos

A β -oxidação, processo de oxidação de ácidos graxos, é um sistema catabólico altamente eficiente que produz uma considerável quantidade de energia para o metabolismo celular. Sua capacidade de geração de ATP varia, podendo resultar na produção de 106 a 129 moléculas de ATP, dependendo do comprimento da cadeia de carbonos nos ácidos graxos oxidados (JANG *et al.*, 2020).

Os substratos essenciais para o processo de oxidação dos ácidos graxos mitocondriais são provenientes de três origens distintas: 1) ácidos graxos da dieta ou transferidos de outros tecidos, que entram na corrente sanguínea; 2) a síntese de ácidos graxos *de novo*; 3) ácidos graxos resultantes da quebra de fosfolipídeos e triglicerídeos dentro das células (GUERRA *et al.*, 2022).

Enquanto os ácidos graxos de cadeia pequena e média atravessam a membrana plasmática e mitocondrial por difusão passiva, sendo convertidos a acil-CoA dentro da matriz mitocondrial, os de cadeia longa atravessam a membrana plasmática com a ajuda de proteínas transportadoras (FATPs), translocase (FAT) e a proteína de ligação a ácidos graxos (FABPs), e são convertidos a acil-CoA ainda no citosol pela ação da acil-CoA sintetase. Como a membrana mitocondrial é impermeável a ésteres de acil-CoA de cadeia longa, a carnitina palmitoilaciltransferase 1 (CPT1) é responsável por catalisar a formação de acilcarnitinas (CARs) a partir de acil-CoA e carnitina. Em seguida, a carnitina-acilcarnitina translocase (CACT) realiza a troca entre a acilcarnitina por uma molécula de carnitina livre da matriz mitocondrial. Por fim, a carnitina palmitoilaciltransferase 2 (CPT2) esterifica a acilcarnitina dentro da matriz mitocondrial em éster de acil-CoA novamente (GUERRA *et al.*, 2022).

Figura 12 – Entrada de ácido graxo na mitocôndria através do sistema transportador acilcarnitina – carnitina.



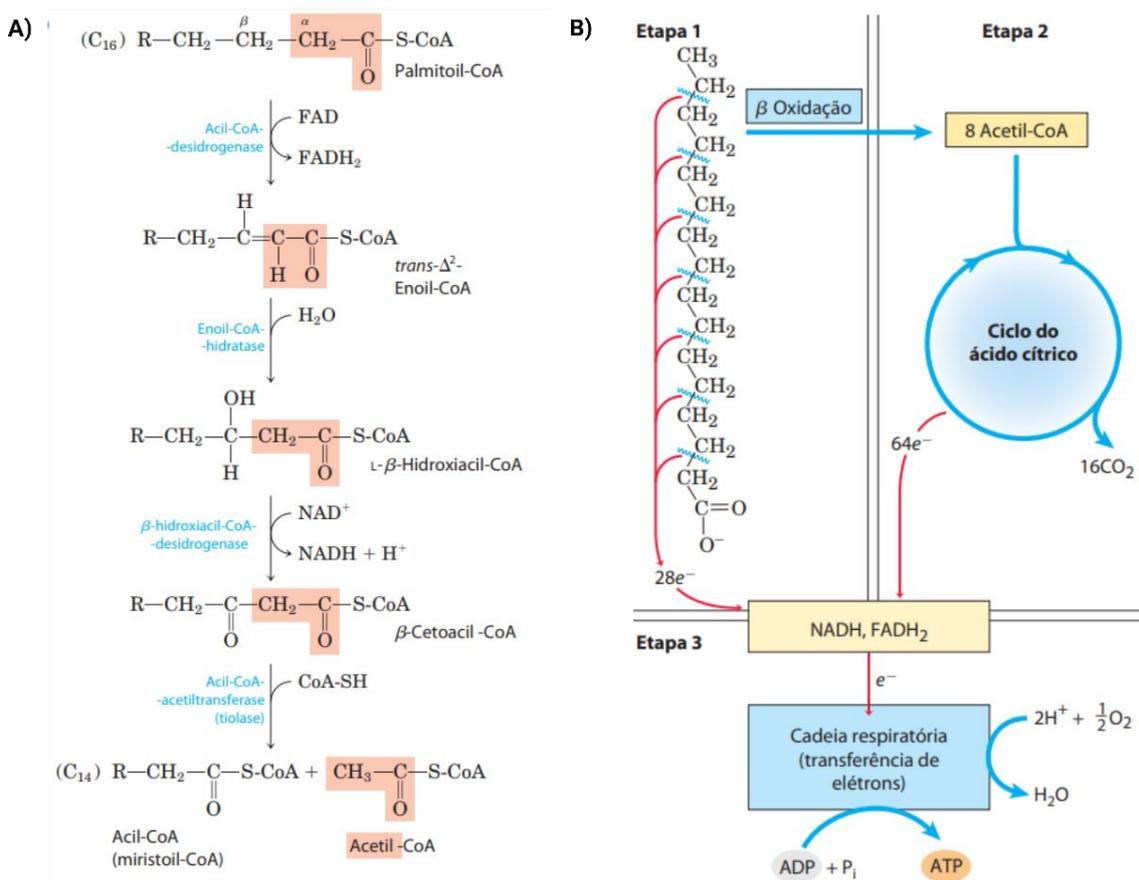
Fonte: NELSON; COX, 2014.

Com as moléculas de acil-CoA dentro da mitocôndria, a β -oxidação tem início. Esse processo é dividido em quatro reações bioquímicas: oxidação, hidratação, segunda oxidação e tiólise. Cada ciclo da oxidação é marcado pela remoção de uma molécula de acetil-CoA do éster de acil-CoA, reduzindo a cadeia em dois carbonos. A primeira etapa de oxidação é catalisada pela acil-CoA desidrogenase, responsável pela introdução de uma ligação dupla na cadeia saturada, gerando um derivado de 2-trans-enoil-CoA. O poder redutor gerado por essa reação é transportado até a ubiquinona por uma flavoproteína transportadora de elétrons. A segunda etapa é catalisada pela enoil-CoA hidratase. Essa enzima faz a hidratação de 2-trans-enoil-CoA em derivados de 3-L-hidroxiacil-CoA. Em seguida, durante a terceira etapa, a 3-L-hidroxiacil-

CoA desidrogenase oxida os ésteres de 3-L-hidroxiacil-CoA em 3-cetoacil-CoA. Por fim, a 3-cetoacil-CoA tiolesterase catalisa a quarta e última etapa da oxidação de ácidos graxos, onde ocorre uma clivagem tiolítica da cadeia de 3-cetoacil-CoA pelo grupo tiol de uma segunda molécula de coenzima A. Essa clivagem resulta em um acetil-CoA e um éster de acil-CoA encurtado por dois átomos de carbono. Como exemplo, a oxidação de palmitoil-CoA (16:0) gera oito moléculas de acetil-CoA (ANDEVA-ANDANNY *et al.*, 2019).

Os acetil-CoA resultantes desse processo catabólico seguem para o ciclo de Krebs, onde serão oxidados a gás carbônico. O poder redutor (NADH e FADH) gerado pela β -oxidação e pelo ciclo do ácido cítrico são encaminhados para a cadeia transportadora de elétrons (NELSON; COX, 2014).

Figura 13 – Representação esquemática da β -oxidação.



Legenda: (A) As quatro reações chaves da β -oxidação. (B) Os caminhos que o acetil-CoA segue após a oxidação do ácido palmítico (16:0).

Fonte: adaptado de NELSON; COX, 2014.

Dietas hipercalóricas

Em indivíduos obesos é descrito que, além de haver relação direta com as comorbidades citadas anteriormente, uma diminuição na qualidade e no tempo de vida, aumento no estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e imunológica e inflamação crônica de baixo grau também estão associadas a essa síndrome metabólica (HAWAI *et al.*, 2021).

As adipocinas secretadas pelo tecido adiposo branco (TAB) estão envolvidas em processos metabólicos e cascatas de sinalização regulando a sinalização de insulina, captação de glicose e a oxidação de ácidos graxos. Contudo, conforme o indivíduo continua a ganhar peso, especialmente lipídeo visceral que se acumula ao redor dos órgãos, os adipócitos expandem seu tamanho para além da capacidade máxima. Esse processo hipertrófico leva ao estresse celular, onde os adipócitos são responsáveis por comprimir os vasos sanguíneos ao redor, reduzindo o suprimento de oxigênio e nutrientes para as células adiposas, causando hipóxia. Esses adipócitos disfuncionais secretam citocinas pró-inflamatórias na fração vascular estromal, tais como TNF- α e IL6, que acabam atraindo macrófagos para o tecido adiposo, levando à formação de estruturas similares a coroas – *crown-like structures*. A inflamação crônica de baixo grau gerada pelos macrófagos acarreta em: 1) resistência à insulina, pois eles interferem na capacidade da célula de responder à insulina, gerando hiperglicemia; 2) disfunção metabólica, aumentando o risco de doenças cardiovasculares; 3) lipotoxicidade gerada pela liberação de ácidos graxos, havendo acúmulo ectópico de lipídeos em órgãos não próprios para armazenamento, como o fígado (SOUZA-TAVARES *et al.*, 2023); 4) estresse do retículo endoplasmático, 5) aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (FERNANDES-DASILVA *et al.*, 2021). Estudos em humanos e camundongos confirmam esse quadro (HAWAI *et al.*, 2021).

Apesar de ser um distúrbio metabólico fatorial, estudos epidemiológicos apontam que a ingestão de alimentos hipercalóricos – principalmente carboidratos e/ou ácidos graxos – é uma das principais causas da incidência da obesidade na atualidade (PINHEIRO-CASTRO *et al.*, 2019).

Estudos foram conduzidos tanto em humanos quanto em camundongos utilizando dietas hipercalóricas a fim de induzir fenótipos similares à obesidade e diabetes do tipo II; no entanto, é igualmente válido considerar pesquisas realizadas em insetos com o mesmo objetivo. Em 2010, utilizando *D. melanogaster*, o pesquisador Ryan Birse e colaboradores demonstraram que a dieta hiperlipídica (HFD) – *high fat diet* – é capaz de causar fenótipos da Síndrome Metabólica

em insetos de forma similar aos mamíferos, onde foi observado um aumento na quantidade de TAG do corpo inteiro da mosca, desregulação na homeostase insulínica e da glicose, além de alterações cardiovasculares que mimetizam a cardiomiopatia diabética humana (BIRSE *et al.*, 2010). Em complemento a esses achados, outros trabalhos também mostram que a dieta suplementada com a lipídeo extraída da polpa do coco altera a capacidade de escalada, o comportamento reprodutivo, a fecundidade, tolerância ao frio e redução da expectativa de vida da mosca (EICKELBERG *et al.*, 2022). O mesmo tipo de indução metabólica foi realizado em outro inseto, conhecido como *Chrysomya megacephala*, demonstrando que a HFD diminui o tamanho e o peso das larvas dessa mosca (LI *et al.*, 2014).

Apesar do metabolismo de lipídeos ser principalmente coordenado por nutrientes como carboidratos e ácidos graxos, alguns estudos já relataram que processos metabólicos como a homeostase energética, o metabolismo de glicose e de lipídeos estão associados com a composição da microbiota intestinal, havendo uma interrelação entre o metabolismo lipídico e os metabólitos microbiais. A composição dietética tem um papel central na modulação da microbiota intestinal, dado que os nutrientes da dieta são metabolizados em metabólitos por esses microrganismos e a dieta é capaz de alterar a composição da microbiota. Logo, perturbações metabólicas também estão associadas a alterações na microbiota intestinal (SCHOELER & CAESAR, 2019).

Explorando a abelha *Apis mellifera* e como diferentes quantidades e tipos de lipídeo afetam seu metabolismo, pesquisadores descobriram que a HFD, principalmente o óleo de palma, provocou diminuição na sobrevivência das abelhas, hiperglicemia e acúmulo de TAG. Porém, esses mesmos fenótipos não foram vistos em abelhas que não apresentavam microbiota intestinal. Com isso, evidencia-se que a HFD possui uma participação chave na digestão e causa um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal desse inseto (ZHENG *et al.*, 2018).

Dietas ricas em carboidratos também foram testadas para investigar o efeito metabólico causado na mosca da fruta. Em 2011, a pesquisadora Laura Musselman e colaboradores demonstraram que larvas da *D. melanogaster* alimentadas com dieta rica em sacarose (HSD) – *high sugar diet* – apresentam níveis de trealose (principal carboidrato presente na hemolinfa dos insetos) e glicose aumentados, indicando hiperglicemia, resistência à insulina e acúmulo de lipídeo. Além da presença desses marcadores de fenótipos da diabetes do tipo II, as moscas também apresentam a expressão de genes relacionados aos processos de síntese e degradação de ácidos graxos – lipogênese e β -oxidação, respectivamente – e síntese de glicose a partir de componentes não-glicídicos – a gliconeogênese – aumentados (MUSSELMAN *et al.*, 2011). Além dessas descobertas, em 2023, outros pesquisadores confirmaram que moscas fêmeas

alimentadas com uma dieta rica em carboidrato tornam-se rapidamente obesas e menos férteis devido ao aumento na morte precoce de cistos germinativos e folículos vitelogênicos (NUNES & DRUMMOND-BARBOSA, 2023)

Na mosca de mesmo gênero, *Drosophila sechellia*, a dieta rica em glicose impacta a função imune, mudança na microbiota e desorganização da estrutura epitelial intestinal da mosca, acarretando em uma diminuição na expectativa de vida. (ABE *et al.*, 2022).

Em comparação às dietas hiperglicídicas e hiperlipídicas, trabalhos com dietas ricas em proteínas (HPD) – *high protein diet* – são escassas e os resultados observados dependem das espécies que são expostas às mesmas. É dito que a prevalência de proteínas sobre carboidratos na dieta de animais onívoros diminui a longevidade, contudo, em insetos modelo a dieta rica em proteína acelera o desenvolvimento e maximiza a fecundidade (YURKEVYCH *et al.*, 2020). Se tratando da *D. melanogaster*, a dieta hiperproteica diminui sua longevidade, acelera o metabolismo e gotículas lipídicas (LI *et al.*, 2022) e promove a produção de ovos (ZANCO *et al.*, 2021). Trabalhos com outros insetos submetidos a dietas hiperproteicas também foram realizados. Larvas de *A. mellifera* alimentadas com dieta rica em proteína apresentam uma taxa de sobrevivência baixa, diminuindo a emergência de abelhas adultas (NICHOLLS *et al.*, 2021). Nos grilos mórmon, *Anabrus simplex*, a alimentação rica em proteínas é responsável por aumentar a resistência à infecção fúngica e a atividade profenoloxidase, componente essencial do sistema imunológico de muitos artrópodes (SRYGLEY & JARONSKI, 2018). Por outro lado, o besouro *Nicrophorus vespilloides* apresenta o quadro inverso quando alimentado com dieta hiperproteica, além de uma redução na quantidade de bactérias na hemolinfa (MILLER & COTTER, 2018).

Por fim, conclui-se que dietas hipercalóricas são responsáveis por induzir distúrbios metabólicos que vão desde o acúmulo de lipídeo até baixa fertilidade em diversos insetos. Contudo, apesar de ser muito explorado para outros fins, o metabolismo lipídico do besouro *T. castaneum* é pouco estudado, havendo poucas informações disponíveis na literatura. Em estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, demonstramos que larvas de 3 milímetros apresentam acúmulo de TAG e aceleração de seu desenvolvimento quando alimentadas com HFD feita com gema de ovo em pó (MOURA-SILVA *et al.*, 2023), sem causar fenótipos diabéticos. Dito isso, esse projeto visa explorar outras fontes calóricas e investigar os efeitos metabólicos na fisiologia e metabolismo de larvas de 5 milímetros do *T. castaneum* ao serem desafiadas por essas dietas obesogênicas.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de dietas hipercalóricas sobre o metabolismo e fisiologia do besouro *Tribolium castaneum*.

1.2. Objetivos específicos

Esse trabalho teve como objetivos específicos:

- a) Otimizar diferentes composições de dietas hiperproteicas, hiperglicídicas e hiperlipídicas para a indução do acúmulo de lipídeo nas larvas;
- b) Avaliar o impacto das dietas hipercalóricas obesogênicas sobre os seguintes parâmetros:
 - Hiperglicemia, estimada pela quantidade de glicose e trealose nas larvas;
 - Expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose e lipídeos, e em vias de sinalização hormonais, nas larvas;
 - Capacidade lipogênica das larvas, estimada pela atividade da ATP-citrato liase (ACLY).
 - Capacidade de desenvolvimento, estimada pelo tamanho ao atingirem o vigésimo primeiro dia de alimentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Tribolium castaneum*, a colônia

Os besouros utilizados para esse projeto foram mantidos em estufa com demanda biológica de oxigênio, em uma temperatura ambiente de 30 °C. Eles foram alimentados com uma dieta padrão de farinha de trigo comercial (Bunge Alimentos, aproximadamente 70 % carboidratos, 11 %, proteínas e 1 % lipídios, enriquecida com 4 a 9 mg de ferro e 140 a 220 microgramas de ácido fólico por 100 g). O seu meio de vivência, ou seja, a farinha de trigo foi trocada semanalmente.

A coleta dos ovos de *T. castaneum* para dar seguimento ao projeto foi feita de forma sincronizada, ou seja, a limpeza dos frascos dos adultos é feita com peneiras granulométricas de 700 µm e 300 µm e os ovos são coletados no dia seguinte. Com isso, sabe-se que a quantidade de ovos recolhida foi posta em um intervalo de 24 horas e todos eclodirão aproximadamente no mesmo intervalo de tempo.

A escolha de trabalhar com larvas do *T. castaneum* é devido ao fato de que elas estão em constante alimentação e 5 milímetros é o tamanho máximo que esses insetos atingem antes de empupar, ou seja, é momento de maior alimentação com a finalidade de acumular reservas energéticas necessária para a metamorfose que vem a seguir.

2.2. Montagem de dietas hipercalóricas

A dieta padrão de farinha de trigo foi suplementada com diferentes concentrações de proteína, lipídios ou de carboidratos. A HFD foi estabelecida com duas fontes alternativas de lipídeos: uma de lipídeo vegetal com adição crescente de azeite (Olisur, 90% de lipídeos totais e aproximadamente 13% de lipídeos saturadas) até 15% v/p, e outra de lipídeo animal com adição crescente de gema de ovo em pó (Shinoda Alimentos) até 60% p/p.

A HSD foi suplementada com adições crescentes de glicose ou sacarose, com proporções de até 60% p/p. Já a HPD foi estabelecida com adições crescentes de triptona, com proporções de até 60% p/p. Essas dietas foram montadas e baseadas de acordo com um projeto realizado com *D. melanogaster* (MUSSELMAN *et al.*, 2011). Todas as concentrações tiveram um volume final total de 20 g, ou seja, a farinha de trigo mais a suplementação escolhida.

Tabela 2 – Tabela nutricional das dietas estabelecidas.

Dietas	Quantidade em kcal		
	Carboidrato	Proteína	Lípido
Farinha de trigo	83%	13%	4%
5% gema de ovo em pó (p/p)	75%	14%	11%
10% gema de ovo em pó (p/p)	68%	14%	17%
15% gema de ovo em pó (p/p)	62%	15%	23%
5% sacarose/glicose (p/p)	84%	12%	4%
10% sacarose/glicose (p/p)	85%	11%	4%
15% sacarose/glicose (p/p)	86%	11%	3%
30% sacarose/glicose (p/p)	89%	9%	2%
60% sacarose/glicose (p/p)	94%	5%	1%
5% triptona (p/p)	78%	18%	4%
10% triptona (p/p)	73%	23%	4%
15% triptona (p/p)	68%	28%	4%
30% triptona (p/p)	55%	42%	3%
60% triptona (p/p)	30%	69%	1%
5% azeite (v/p)	71%	11%	18%

2.3. Quantificação de proteína total

A dosagem de proteínas foi realizada seguindo o protocolo Lowry, descrito em 1951 (LOWRY, 1951). Para isso, foi utilizado tartarato de sódio, sulfato cuproso, água destilada, reagente Folin-Ciocalteu e solução cuproalcalina (SCA) (2 % Na_2CO_3 em 0,1N NaOH). As larvas alimentadas com dietas hipercalóricas foram homogêneas em 300 μ L de PBS (tampão fosfato-salino 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM), quatro semanas após a alimentação. A quantificação de proteínas foi lida em um leitor de placas após as amostras terem sido

pipetadas em uma placa de 96 poços. 40 μL de água destilada foi adicionada no primeiro poço para ser o branco, havendo uma redução de 5 μL para cada ponto da curva padrão até o limite de 20 μL de água total. Em seguida, foi adicionado de 0 μL a 20 μL de BSA 0,02 % p/v (albumina bovina sérica). 200 μL de SCA foram pipetados em cada poço e, ao final, 20 μL de reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada na proporção de 1:2). Os poços destinados às amostras receberam 35 μL de água destilada e 5 μL de amostra (diluída em água destilada na proporção de 1:10). As mesmas quantidades de SCA e Folin utilizadas na curva padrão de albumina foram utilizadas para as amostras. Por fim, a placa foi incubada em temperatura ambiente por trinta minutos e, em seguida, as amostras foram lidas por um espectrômetro leitor de placa com absorvância de 660 nm, obedecendo à lei de Lambert-Beer, e a quantificação de proteínas foi calculada comparando a absorvância das amostras com a curva padrão de albumina de soro bovino.

O objetivo desse ensaio utilizando o método Lowry (LOWRY, 1951) foi normalizar os resultados das amostras de triacilglicerol, glicose e trealose, glicogênio, e atividade enzimática da ACLY. O objetivo dessa normalização tem como base descontar as possíveis diferenças de tamanho que as larvas possam apresentar durante as coletas. Para esse experimento, foram utilizados 10 tubos de cada concentração das dietas contendo 3 larvas de 5 milímetros.

2.4. Quantificação de triacilglicerol (TAG)

A quantificação de TAG nas amostras foi realizada através de um ensaio colorimétrico enzimático. Para isso, as larvas alimentadas com dietas hipercalóricas foram homogeneizadas em 300 μL de PBS (tampão fosfato-salino 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM), quatro semanas após a alimentação. A quantificação foi realizada após as amostras terem sido pipetadas em uma placa de 96 poços. 10 μL de amostra foram adicionados a 200 μL de reagente do kit clínico Triglicérides Monoreagente (Intertec Katal) e incubadas a 37 °C por trinta minutos. A absorvância foi medida a 540 nm, e a quantidade de TAG foi calculada comparando a absorvância das amostras com a de uma curva padrão de glicerol. Para a realização dessa dosagem, foram utilizados 10 tubos de cada concentração das dietas contendo 3 larvas de 5 milímetros.

2.5. Quantificação de carboidrato total, trealose e glicogênio

Essas dosagens seguiram um protocolo já estabelecido e realizado com mosquitos (HANDEL, 1985). Para tal, foi utilizado reagente Antrona (30 mL de água destilada, 76 mL de H_2SO_4 , 150 mg de antrona), água destilada e padrão para cada um dos carboidratos totais e glicogênio (1 mg/ml em etanol 25 % v/v).

2.5.1. Preparação das amostras

As larvas alimentadas com triptona ou azeite foram homogeneizadas em 100 μ L de PBS (tampão fosfato-salino 10 mM, pH 7,4, NaCl 150mM). Uma alíquota de 10 μ l foi separada para dosagem de proteína (amostras diluídas 1:50). O restante foi adicionado de 90 μ L de sulfato de sódio 4 % p/v. As amostras foram divididas pela metade em dois tubos de microcentrífuga, 1 mL de etanol foi adicionado a cada um, sendo posteriormente agitados no vortex. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 3.000 g O sobrenadante foi utilizado para dosagem de carboidrato total e trealose, enquanto que o precipitado foi utilizado para quantificação de glicogênio.

2.5.2. Determinação de carboidrato total

A quantificação foi realizada após as amostras terem sido pipetadas em uma placa de 96 poços. Devido à necessidade de utilizar o banho seco, a curva padrão e as amostras foram preparadas primeiramente em tubos de microcentrífuga. Para o branco, 100 μ L de água destilada foram adicionados. Para a curva padrão, foram estabelecidos pontos de 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L e 40 μ L de padrão de glicose, os quais foram completados com etanol até atingirem um volume final de 100 μ L. Em seguida, 1 mL de antrona foi adicionado a cada tubo. Já os tubos com amostras receberam 100 μ L de amostra e a mesma quantidade de antrona adicionada à curva. Por fim, as amostras foram incubadas em banho seco a 90 °C por 17 minutos, e 200 μ L foram despejados na placa de 96 poços e lidos por um espectrômetro leitor de placa com absorvância de 625 nm. A

quantificação de glicose foi calculada comparando a reação por antrona das amostras e a curva padrão de glicose (10 mg/ml). Para essa dosagem, foram utilizados 10 tubos de cada concentração, contendo 6 larvas de 5 milímetros cada.

2.5.3. Determinação de trealose

A quantificação de trealose foi realizada após 500 µL de amostra terem sido incubados a 90 °C, com a tampa do tubo aberta, para evaporar o metanol e concentrar o carboidrato. Foram coletados 100 µL ao final para a realização do experimento. Devido à necessidade de utilizar o banho seco, a curva padrão e as amostras foram preparadas primeiramente em tubos de microcentrífuga. Para o branco, 100 µL de água destilada foram adicionados. Para a curva padrão, foram estabelecidos pontos de 5 µL, 10 µL, 20 µL e 40 µL de padrão de trealose, os quais foram completados com etanol até atingirem um volume final de 100 µL. Foi adicionado 50 µL de HCl 1M em todos os tubos, que foram incubados a 90°C por 7 (sete) minutos. Em seguida, 150 µL de NaOH 1M também foram adicionados aos tubos, que foram incubados a 90°C por mais 7 (sete) minutos. Por fim, 1 mL de antrona foi adicionado aos tubos, que foram incubados por 17 (dezesete) minutos. Posteriormente, 200 µL foram despejados na placa de 96 poços e lidos por um espectrômetro leitor de placa com absorvância de 625 nm. A quantificação de trealose foi calculada comparando a reação por antrona das amostras com a curva padrão de trealose (10 mg/ml). Para essa dosagem, foram utilizados 10 tubos de cada concentração, contendo 6 larvas de 5 milímetros cada.

2.5.4. Determinação de glicogênio

A quantificação de glicogênio foi realizada após o pellet formado ter sido ressuspenso em 100 µL de metanol.

A quantificação foi realizada após as amostras terem sido pipetadas em uma placa de 96 poços. Devido à necessidade de utilizar o banho seco, a curva padrão e as

amostras foram preparadas primeiramente em tubos de microcentrífuga. Para o branco, foram adicionados 100 μL de água destilada. Para a curva padrão, foram estabelecidos pontos de 5 μL , 10 μL , 20 μL e 40 μL de padrão de glicogênio, que foram completados com etanol até atingirem um volume final de 100 μL . Em seguida, 1 mL de antrona foi adicionado a cada tubo. Já os tubos com amostras receberam 100 μL de amostra e a mesma quantidade de antrona adicionada à curva. Por fim, as amostras foram incubadas em banho seco a 90 °C por 17 minutos. Foram despejados 200 μL na placa de 96 poços e lidos por um espectrômetro leitor de placa com absorvância de 625 nm. A quantificação de glicogênio foi calculada comparando a reação por antrona das amostras com a curva padrão de glicogênio (10 mg/ml). Para essa dosagem, foram utilizados 10 tubos de cada concentração, contendo 6 larvas de 5 milímetros cada.

2.6. Análise de expressão gênica por PCR quantitativo e transcriptoma

Para analisar o efeito das dietas hipercalóricas na expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, carboidratos e na sinalização endócrina do *T. castaneum*, larvas de 5 milímetros foram coletadas e submetidas aos processos descritos abaixo.

2.6.1. Extração de RNA total

Para a extração de RNA total, larvas de 5 milímetros (5 larvas por tubo) foram homogeneizadas em 500 μL de TRI Reagent (Sigma-Aldrich) em tubos de microcentrífuga e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 15 (quinze) minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos de microcentrífuga e foi adicionado 200 μL de clorofórmio a cada um. As amostras foram levadas ao vortex por 10 (dez) segundos e centrifugadas novamente a 3.000 g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes (200 μl) foram transferidos mais uma vez para outros tubos de microcentrífuga e 200 μL de isopropanol foram adicionados. As amostras foram misturadas por inversão, incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 3.000 g por 15

minutos a 4 °C novamente. Os sobrenadantes foram descartados, os precipitados lavados com 1 mL de etanol 70 % e centrifugados uma última vez a 3.000 g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados novamente e os pellets de RNA formados foram ressuspensos em 50 µL de H₂O-DEPC 0,1 % (Sigma-Aldrich).

2.6.2. Dosagem de RNA

As amostras de RNA foram dosadas com Nanodrop Lite (Thermo Fischer Scientific). Em seguida, a qualidade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1 % (20 mL de TAE (Tris-Acetato-EDTA; Tris-Acetato 2M, EDTA 0,05M, pH 8) 1x com 0,2 g de agarose), 70 V por 30 minutos.

2.6.3. Remoção da contaminação por DNA genômico

As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich). Em um tubo de 0,2 mL no gelo, foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µL do tampão de DNase I 10 x, 1 µL de DNase I (1 U/µL) e H₂O-DEPC em quantidade suficiente para completar 10 µL de volume final. As amostras foram incubadas por 30 (trinta) minutos a 37 °C no termociclador e depois adicionado 1 µL de EDTA 25 mM. As amostras foram incubadas novamente no termociclador a 65°C por 10 minutos.

2.6.4. Síntese da primeira fita de DNA complementar

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reserve Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Aos 11 µL obtidos ao final do tratamento para remoção de DNA genômico, foram adicionados 2,2 de tampão de

reação (10 x), 0,9 µL de dNTP (100 mM), 2,2 µL de iniciadores aleatórios (10 x), 1,1 µL de Transcriptase Reversa (50 U/µL) e H2O-DEPC 0,1 % para completar 22 µL de volume final. Um tubo extra foi utilizado com a última amostra para ser o controle negativo (sem Transcriptase Reversa, volume substituído por H2O-DEPC 0,1%). As amostras então foram incubadas por 10 minutos a 25 °C e depois a 37 °C por 2 horas no termociclador. Ao final, as amostras de cDNA foram diluídas 5 x completando um volume de 110 µL e mantidas a -20 °C até o momento de uso.

2.6.5. PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando qPCRBio SyGreen Mix (PCR Biosystems) de acordo com o protocolo descrito abaixo.

A cada poço de uma placa óptica de 96 poços foram adicionados 7,5 µL do qPCRBio SyGreen Mix (2 x), 3 µL de amostra de cDNA, valores que variam de 0,15 µL a 0,6 µL de cada iniciador senso e anti-senso de cada gene e H2O-DEPC 0,1 % para completar 15 µL de volume final. Tanto os brancos (preenchidos com água livre de nuclease) como os pontos experimentais foram realizados em duplicatas. O programa de variação de temperatura utilizado por: 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C de 45 segundos, seguido por uma curva de dissociação. A eficiência de amplificação foi determinada pelos ciclos de quantificação (Cq) obtidos a partir de qPCR utilizando cDNA diluído em série como template.

As sequências e concentrações dos primers utilizados para amplificação dos genes analisados em *T. castaneum* nesse projeto estão descritos na tabela a seguir (Tabela 3). A expressão gênica da proteína ribossomal S18 foi utilizada como gene referência (TOUTGES *et al.*, 2010). Os valores de expressão gênica são relativos à expressão do gene de referência.

Tabela 3 – Sequência de *primers* e concentrações utilizados para qPCR.

GeneID (<i>BeetleBase</i>)	Concentração	Sequência do Primer	Volume
<i>TcACLY (TC015096)</i>	600 nM	<i>Foward</i> - 5'-TGGTGTATTGGGACCTGTGC-3' <i>Reverse</i> - 5'-TTGGCCGTTGCTGTTTCTTG-3'	0,6 µL

<i>TcFAS</i> (TC011322)	300 nM	<i>Foward</i> - 5'-CCCAAGGAACAATTGGCAGC-3' <i>Reverse</i> - 5'-GAGCGTGACTGGACCTTTGA-3'	0,3 µL
<i>TcG6PDH</i> (TC013648)	600 nM	<i>Foward</i> - 5'-TGAATGAACGGAAGGCCGAA-3' <i>Reverse</i> - 5'-TGCACCCTGATGACCAGTTC-3'	0,6 µL
<i>TcACC</i> (TC015612)	150 nM	<i>Foward</i> - 5'-CAGGAGGACATTTTCCCCCAA-3' <i>Reverse</i> - 5'-CGATGAGTGCCTTTTGCTCC-3'	0,15 µL
<i>TcACSL5</i> (TC006471)	300 nM	<i>Foward</i> - 5'-GCGGTGGAGGAACATGGAC-3' <i>Reverse</i> - 5'-TGGCTAGGTAGAAGGCCGAA-3'	0,3 µL
<i>TcDGAT</i> (TC014471)	300 nM	<i>Foward</i> - 5'-CAGTGCCTTCTTCCACGAGT-3' <i>Reverse</i> - 5'-GATGTTGCTGAGCGGGATCT-3'	0,3 µL
<i>TcBmm</i> (TC007628)	300 nM	<i>Foward</i> - 5'-GGGTATTCAAACACCGGGGA-3' <i>Reverse</i> - 5'-CCGCAGCCATCAACTTGGTA-3'	0,3 µL
<i>TcCPT1</i> (TC002462)	600 nM	<i>Foward</i> - 5'-TTACATGGACAGGGCGGTTC-3' <i>Reverse</i> - 5'-GCTAAAAGCACGCGAGGAG-3'	0,6 µL
<i>TcACSL4</i> (TC014440)	300 nM	<i>Foward</i> - 5'-AAATCCACCCCGATGGTGTC-3' <i>Reverse</i> - 5'-GGGCCTCGACTTTACCCAAA-3'	0,3 µL
<i>TcTPS</i> (TC007883)	300 nM	<i>Foward</i> - 5'-ATGGCTTATGGGTGGGTTGG-3' <i>Reverse</i> - 5'-CCGTAGGCGTGATATCGTCC-3'	0,3 µL
<i>TcAKHR</i> (TC009772)	450 nM	<i>Foward</i> - 5'-GGTATGCAGGCGATGCAATG-3' <i>Reverse</i> - 5'-GTCGACACTGATGCAGACGA-3'	0,45 µL
<i>TcILP-1</i> (TC008480)	300 nM	<i>Foward</i> - 5'-CTGTGGGATTTTCGCTTGGC-3' <i>Reverse</i> - 5'-GTA ACTCTGGCCCGCATTGA-3'	0,3 µL
<i>TcILP-2</i> (TC007035)	300 nM	<i>Foward</i> - 5'-TCCACGGTATGCAAAGGCAA-3' <i>Reverse</i> - 5'-TATGCTGGGACAACGATGGG-3'	0,3 µL
<i>TcPEPCK</i> (TC009072)	450 nM	<i>Foward</i> - 5'-GGACAAACTCGCCGATGGTA-3' <i>Reverse</i> - 5'-TACGTTCTGGGTCACAAGGC-3'	0,45 µL
<i>TcGAPDH</i> (TC009072)	450 nM	<i>Foward</i> - 5'-GGACAAACTCGCCGATGGTA-3' <i>Reverse</i> - 5'-TACGTTCTGGGTCACAAGGC-3'	0,45 µL

Legenda: TcACLY – ATP-citrato liase; TcFAS – Ácido graxo sintase; TcG6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase; TcACC – Acetil-CoA carboxilase; TcACSL5 – Acil-CoA sintetase de cadeia longa 5; TcDGAT – Diacilglicerol aciltransferase; TcBmm – Lipase *brummer*; TcCPT1 – Carnitina palmitoilaciltransferase 1; TcACSL4 – Acil-CoA sintetase de cadeia longa 4; TcTPS – Trealose fosfato sintase; TcAKHR – Receptor do hormônio adipocinético; TcILP-1 – Peptídeo similar à insulina 1; TcILP-2 – Peptídeo similar à insulina 2; TcPEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase; TcGAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase;

A eficiência de amplificação, a inclinação da curva de cDNA (*slope*), a interceptação y e o r² estão descritos na tabela abaixo (Tabela 4).

Tabela 4 – Informações obtidas a partir das curvas de calibração dos *primers* para genes envolvidos no metabolismo lipídico.

Gene (<i>BettleBase</i>)	Amplificação (pb)	<i>Slope</i>	Interceptação y	r ²	Eficiência (%)
<i>TcACLY</i> (TC015096)	98	-3.271±0.186	20.81±0.24	0.9936	102.17
<i>TcFAS1</i> (TC011522)	102	-3.471±0.049	18.63±0.10	0.9988	94.13
<i>TcG6PDH</i> (TC013648)	100	-3.341±0.146	22.78±0.21	0.9925	99.21
<i>TcACC</i> (TC015612)	109	-3.262±0.212	21.34±0.31	0.9834	102.56
<i>TcACSL5</i> (TC006471)	110	-3.342±0.053	25.18±0.10	0.9987	99.17
<i>TcDGAT</i> (TC014471)	100	-3.405±0.147	26.57±0.27	0.9907	96.65
<i>TcBmm</i> (TC007628)	105	-3.090±0.104	22.18±0.21	0.9933	110.68
<i>TcCPT1</i> (TC002462)	99	-3.162±0.044	21.27±0.09	0.9989	107.14
<i>TcACSL4</i> (TC014440)	99	-3.286±0.413	19.74±0.85	0.9136	101.52
<i>TcTPS</i> (TC007883)	89	-3.428±0.089	24.33±0.18	0.9953	95.76
<i>TcAKHR</i> (TC009772)	94	-3.175±0.427	23.83±0.98	0.8471	106.52
<i>TcILP-1</i> (TC008480)	109	-3.689±0.116	26.10±0.25	0.9990	86.67
<i>TcILP-2</i> (TC007035)	103	-3.750±0.136	23.96±0.29	0.9987	84.78
<i>TcPEPCK</i> (TC009072)	106	-3.038±0.142	19.49±0.39	0.9787	113.39
<i>TcGAPDH</i> (TC006170)	104	-3.240±0.106	17.82±0.29	0.9895	103.54

Legenda: *TcACLY* – ATP-citrato liase; *TcFAS* – Ácido graxo sintase; *TcG6PDH* – Glicose-6-fosfato desidrogenase; *TcCC* – Acetil-CoA carboxilase; *TcACSL5* – Acil-CoA sintetase de cadeia longa 5; *TcDGAT* – Diacilglicerol aciltransferase; *TcBmm* – Lipase brummer; *TcCPT1* – Carnitina palmitoilaciltransferase 1; *TcACSL4* – Acil-CoA sintetase de cadeia longa 4; *TcTPS* – Trealose fosfato sintase; *TcAKHR* – Receptor do hormônio adipocinético; *TcILP-1* – Peptídeo similar à insulina 1; *TcILP-2* – Peptídeo similar à insulina 2; *TcPEPCK* – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase; *TcGAPDH* – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

2.6.6. RNAseq

Os pellets de RNA formados foram ressuspensos em 50 µL de H₂O-DEPC 0,1 %. As amostras foram dosadas no Nanodrop e sua qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose 1 %, 180 V por 16 minutos. Duas purificações com 100 µL de etanol absoluto e 5 µL de acetato de sódio cada foram necessárias para limpar o fenol contaminante. Em seguida, as amostras purificadas foram secas em SpeedVac por 1 hora; 5 µg de amostra de RNA em 20 µL de volume final foram necessários para a

análise transcriptômica. Após a secagem, as amostras foram enviadas para a empresa Genone para a realização do sequenciamento dos genes, e os dados bioinformáticos foram lidos em colaboração com o professor Rafael Dias Mesquita, do Laboratório de Bioinformática, Instituto de Química, UFRJ.

2.7. Atividade enzimática da ATP-citrato liase

A atividade da ACLY foi medida conforme descrito em outro artigo (NASCIMENTO *et al.*, 2021). Larvas de 5 milímetros de *T. castaneum* foram homogeneizadas em um tampão Tris-HCl de 0,1 mM, pH 7,2. As amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado. A quantidade de proteína foi medida conforme descrito acima. As reações continham Tris-HCl 100 mM, pH 7,3, MgCl₂ 10 mM, citrato 20 mM, ATP 5 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, malato desidrogenase 2 U/ml, NADH 0,15 mM, coenzima A 0,3 mM e 40 µg de proteína. As reações em branco não continham coenzima A. As reações foram incubadas a 37 °C por 1 hora, com leituras de absorbância a 340 nm a cada minuto. A atividade da ACLY foi estimada pela redução da absorbância a 340 nm, correspondente à oxidação do NADH.

2.8. Desenvolvimento larval

Larvas foram coletadas após 28 dias da sincronização e medidas utilizando um microscópio estereoscópico.

2.9. Análise estatística

Os gráficos foram gerados utilizando o software GraphPad 9.0.0 e PantherDB para as anotações gênicas. As análises de significância estatística foram realizadas após verificar se todos os dados seguem a distribuição normal. Todos os dados são apresentados por média ± EP (erro padrão). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para as dosagens de TAG com diversas concentrações, com exceção da dieta suplementada com azeite que foi utilizado

teste de Mann-Whitney. O atraso no desenvolvimento foi aferido pelo teste de Qui-quadrado. Para a expressão gênica e a dosagem de carboidratos foram aplicados teste t não pareado, com correção de Welch caso houvesse variância significativa entre as amostras, ou teste de Mann-Whitney. As diferenças significativas são representadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

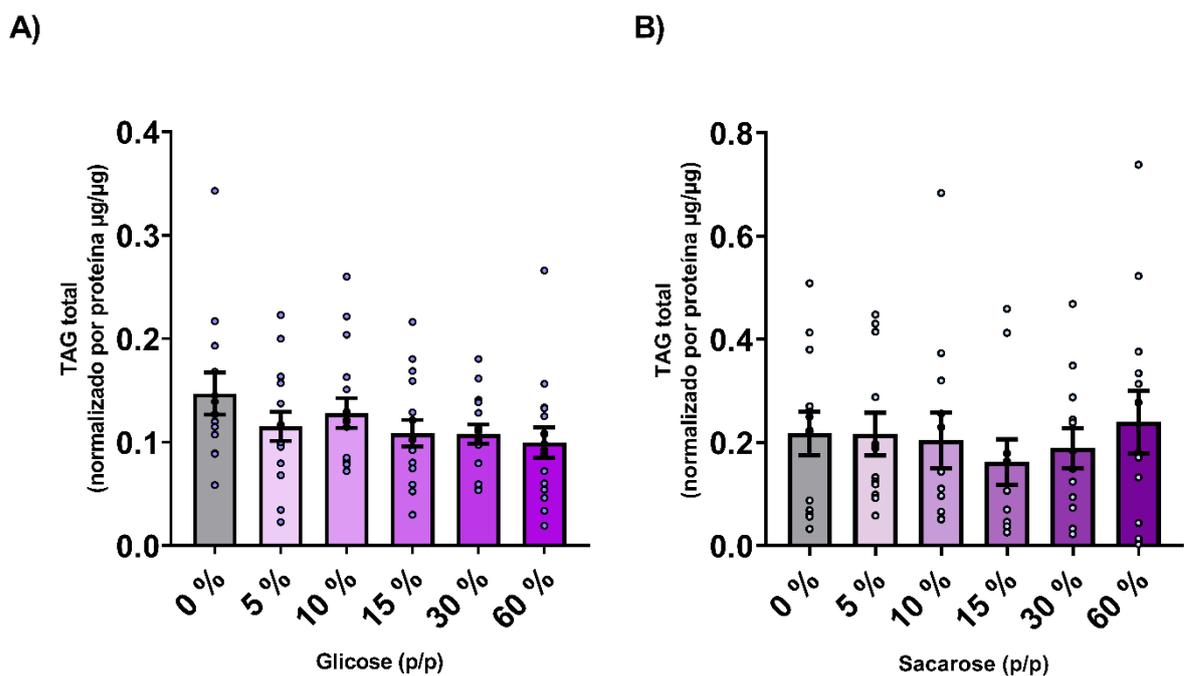
3. RESULTADOS

3.1. Acúmulo de triacilglicerol mediado por dietas hipercalóricas e desenvolvimento

3.1.1. Dietas ricas em carboidratos não alteram a quantidade de TAG das larvas

Duas fontes de carboidratos foram testadas: a glicose, monossacarídeo que é utilizado como fonte primária de energia pelas células, e a sacarose, um dissacarídeo que é primeiramente quebrado em glicose e frutose, para depois ser absorvido pelo intestino. Para investigar os efeitos dos carboidratos no metabolismo do *T. castaneum*, larvas do inseto foram expostas a essas dietas suplementadas com glicose (Fig. 14A) ou sacarose (Fig. 14B), em diferentes concentrações, desde o momento de eclosão dos ovos até atingirem 5 milímetros de comprimento. Para as larvas controle, a dieta foi feita somente com farinha de trigo. Nenhuma das concentrações de glicose ou frutose foram responsáveis por alterar a quantidade de lipídeo presente no corpo inteiro das larvas de *T. castaneum*.

Figura 14 – Dietas suplementadas com glicose ou frutose não alteram a quantidade de lipídeo das larvas de *T. castaneum*.



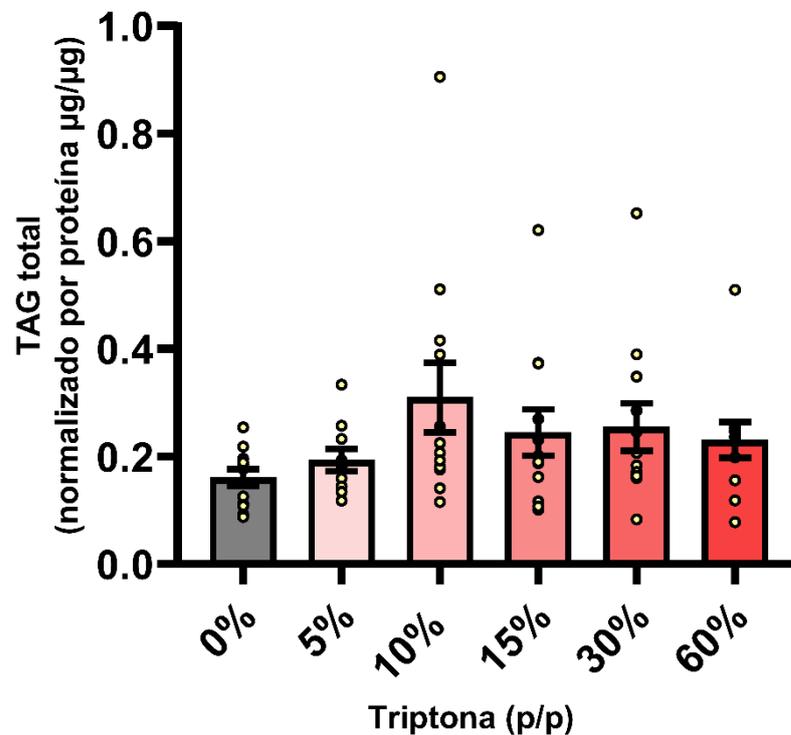
Legenda: Ovos sincronizados de *T. castaneum* foram submetidos a diversas concentrações de dietas suplementadas com sacarose ou glicose e larvas de 5mm foram coletadas e homogeneizadas em solução tampão. A quantidade de triacilglicerol foi medida por meio de um ensaio enzimático colorimétrico, e normalizado pela quantidade de proteína pelo método de Lowry. As barras representam a média \pm erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. A) Dieta suplementada com glicose não altera a quantidade de TAG, n = 13-16, Kruskal-Wallis, p = 0,3466. B) Dieta suplementada com sacarose não altera a quantidade de TAG, n = 11-13, Kruskal-Wallis, p = 0,9006

Fonte: O autor, 2024

3.1.2. Dieta rica em proteína não altera a quantidade de TAG das larvas

Para a dieta rica em proteína, a triptona foi utilizada; um hidrolisado da caseína, proteína do leite. Para investigar os efeitos de uma dieta rica em proteína no metabolismo do *T. castaneum*, larvas do inseto foram expostas a essa dieta suplementada com triptona em diferentes concentrações, desde o momento de eclosão dos ovos até atingirem 5 milímetros de comprimento (Fig. 15). Para as larvas controle, a dieta foi feita somente com farinha de trigo. Nenhuma das concentrações de triptona foram responsáveis por alterar a quantidade de lipídeo presente no corpo inteiro das larvas de *T. castaneum*. Devido à falta de informações na literatura referente à HPD nesse besouro modelo e fazendo uma comparação direta com a barra controle, a concentração de 10 % p/p foi levada adiante para investigações mais detalhadas.

Figura 15 – Dieta hiperproteica não altera a quantidade de TAG.



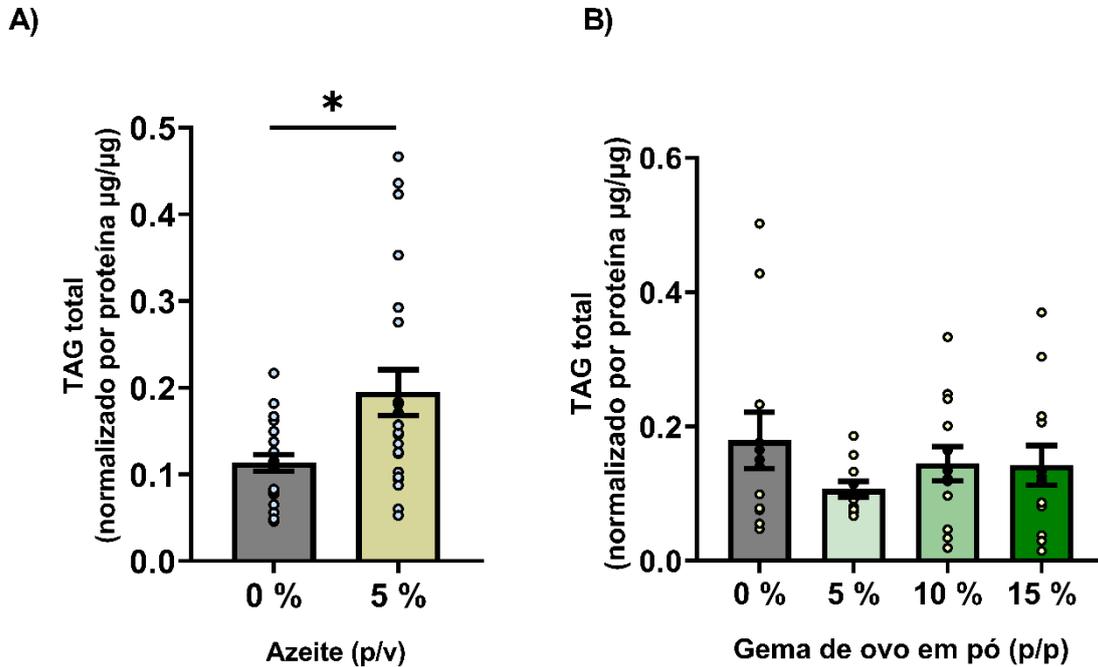
Legenda: Ovos sincronizados de *T. castaneum* foram submetidos a diversas concentrações de dietas suplementadas com triptona e larvas de 5 mm foram coletadas e homogeneizadas em tampão salino. A quantidade de triacilglicerol foi medida por meio de um ensaio enzimático colorimétrico, e normalizado pela quantidade de proteína pelo método de Lowry. As barras representam a média \pm erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. Dieta suplementada com triptona não altera a quantidade de TAG, $n = 10-12$, Kruskal-Wallis, $p = 0,2533$.

Fonte: O autor, 2024

3.1.3. Dietas ricas em lipídeo aumentam o TAG e atrasam o desenvolvimento larval

Para avaliar os efeitos de dietas hiperlipídicas, larvas do inseto foram expostas a duas fontes lipídicas distintas: suplementação com gema de ovo em pó, ácidos graxos saturados; e óleo de oliva ou azeite, ácido graxo monoinsaturado. Larvas do inseto foram submetidas às dietas em diferentes concentrações de azeite ou gema de ovo em pó, desde o momento de eclosão dos ovos até atingirem 5 milímetros de comprimento. Para as larvas controle, a dieta foi feita somente com farinha de trigo. Devido à dificuldade em homogeneizar o azeite em farinha de trigo, maiores concentrações não puderam ser feitas. Considerando a quantidade de TAG no corpo inteiro do animal, apenas a dieta rica em azeite apresentou um aumento significativo em sua composição (Fig. 16A).

Figura 16 – Duas fontes de dietas hiperlipídicas, azeite e gema de ovo em pó. Apenas a dieta suplementada com azeite aumenta significativamente a quantidade de TAG dos insetos alimentados.

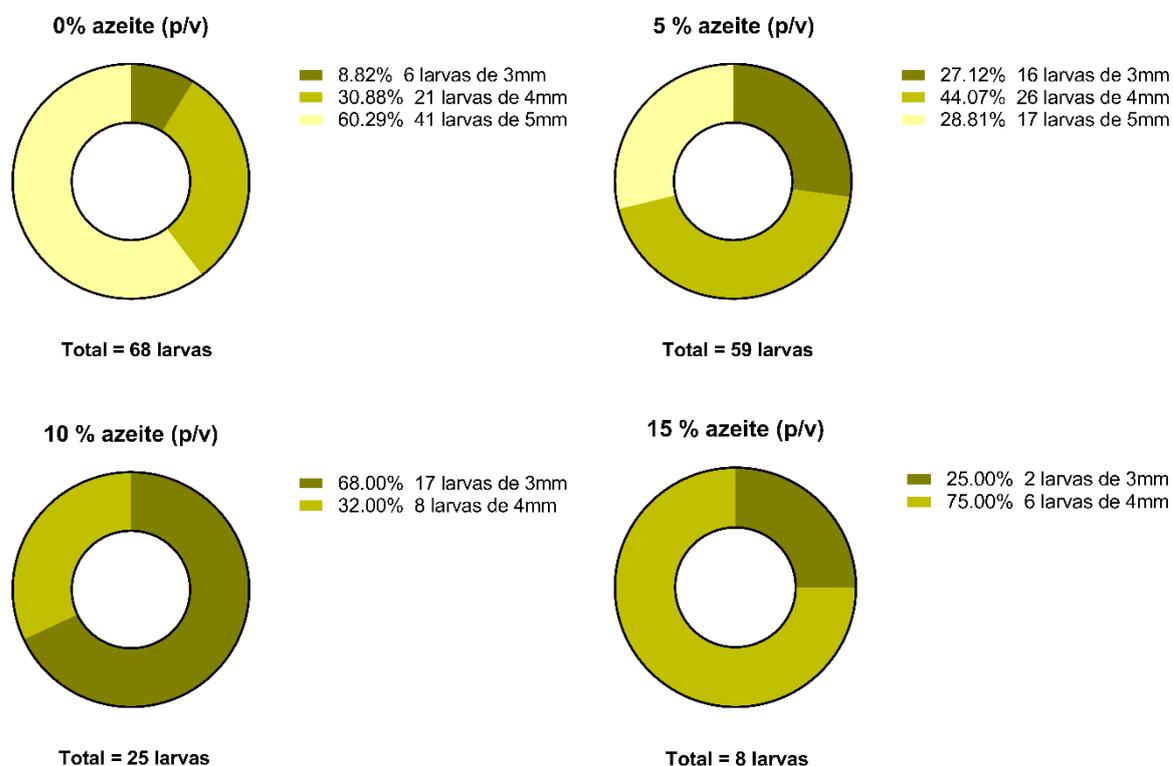


Legenda: Ovos sincronizados de *T. castaneum* foram submetidos às dietas suplementadas com azeite ou gema de ovo em pó, e larvas de 5 mm foram coletadas para contagem e homogeneizadas em tampão salino. A quantidade de triacilglicerol foi medida por meio de um ensaio enzimático colorimétrico, e normalizado pela quantidade de proteína pelo método de Lowry. As barras representam a média \pm erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. A) Larvas alimentadas com azeite apresentam aumento de TAG, $n = 22$, Mann-Whitney, $p = 0,0184$. B) Larvas alimentadas com gema de ovo em pó não apresentam alterações na quantidade de TAG, $n \geq 11$, teste Kruskal-Wallis, $p = 0,5930$.

Fonte: O autor, 2024.

Apesar do aumento na quantidade de lipídeo ter sido confirmada em apenas uma das dietas, foi observado um atraso no crescimento e na mortalidade do inseto em ambas as dietas de forma dose-dependente. Para a observação desse fenômeno, maiores concentrações foram montadas para alimentação suplementada com azeite, considerando dietas com até 15 % de suplementação (Fig. 17).

Figura 17 – Larvas alimentadas com dieta suplementada com azeite apresentam um atraso no crescimento e um aumento na mortalidade de forma dose-dependente.

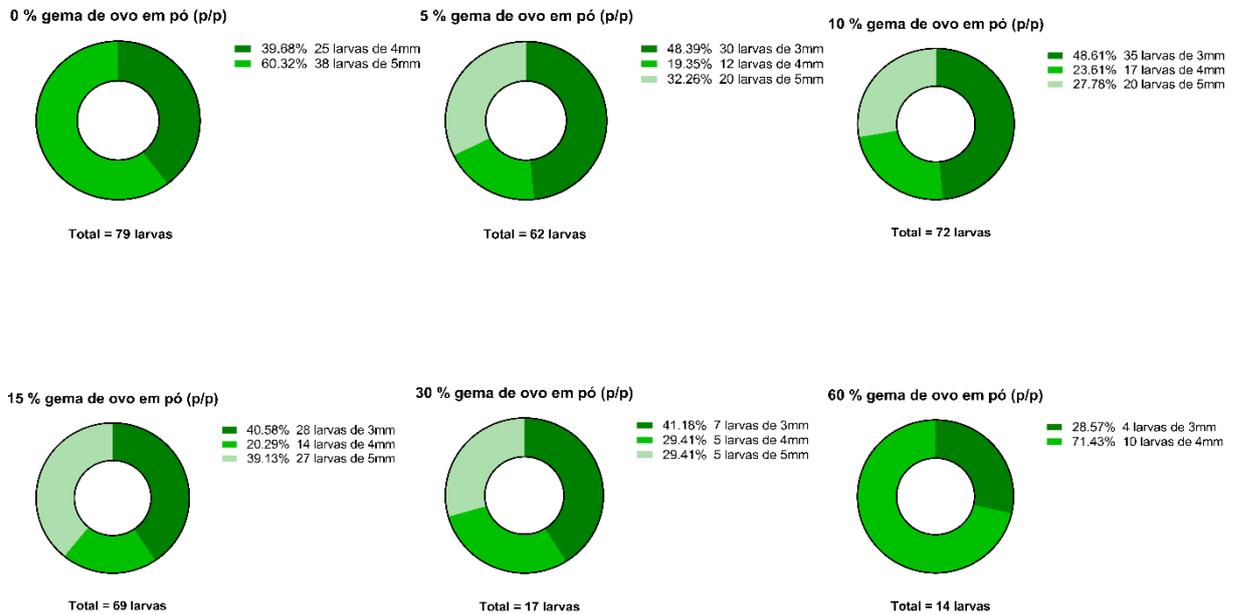


Legenda: Ovos sincronizados de *T. castaneum* foram submetidos à dieta suplementada com gema de ovo em pó e as larvas foram coletadas após 28 dias de alimentação. As cores nas barras representam a proporção de cada tamanho larval no total de larvas em cada dieta. Dieta suplementada com gema de ovo em pó, n = 313, teste Qui-quadrado, 5 %, p < 0.0001; 10 %, p < 0.0001; 15 %, p < 0.0001; 30 %, p = 0.0785; 60 %, p = 0.0008.

Fonte: O autor, 2024.

Para confirmar o atraso e a mortalidade das larvas alimentadas com gema de ovo em pó, as mesmas concentrações da dosagem de TAG foram utilizadas para a coleta e contagem (Fig. 18).

Figura 18 – Larvas alimentadas com dieta suplementada com gema de ovo em pó também apresentam um atraso no crescimento e um aumento na mortalidade de forma dose-dependente.



Legenda: Ovos sincronizados de *T. castaneum* foram submetidos à dieta suplementada com gema de ovo em pó e as larvas foram coletadas após 28 dias de alimentação. As cores nas barras representam a proporção de cada tamanho larval no total de larvas em cada dieta. Dieta suplementada com gema de ovo em pó, n = 313, teste Qui-quadrado, 5 %, $p < 0.0001$; 10 %, $p < 0.0001$; 15 %, $p < 0.0001$; 30 %, $p = 0.0785$; 60 %, $p = 0.0008$.

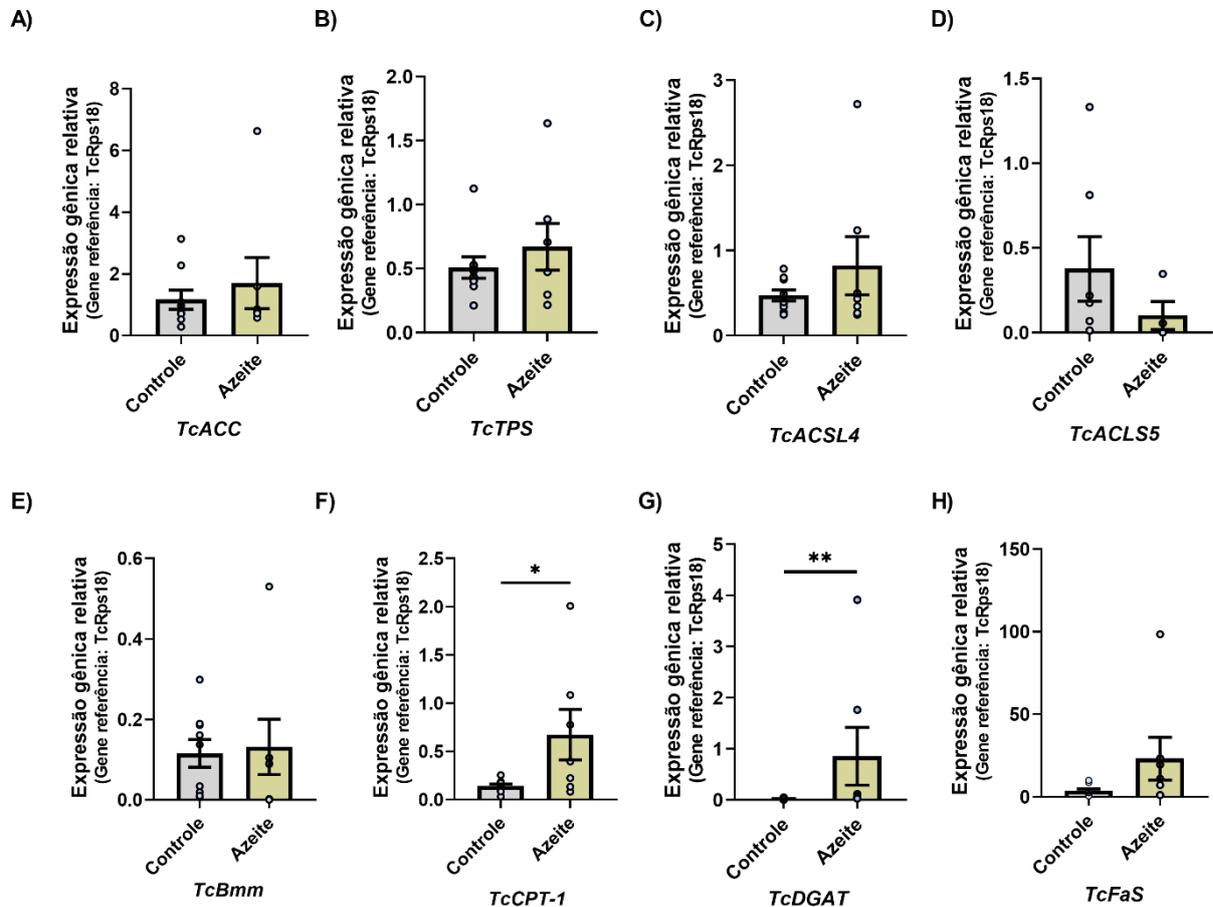
Fonte: O autor, 2024.

3.2. Perfil de expressão gênica de genes do metabolismo de lipídeos, carboidratos e sinalização endócrina

Dando seguimento as investigações, os níveis de RNAm de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, carboidratos e vias de sinalização endócrina foram analisados em larvas alimentadas com dietas suplementadas com azeite (5 % v/p) ou triptona (10 % p/p).

A HFD foi responsável por alterar a expressão de dois genes do metabolismo de lipídeos. A carnitina-palmitoilaciltransferase 1 ou CPT-1, gene responsável pela beta-oxidação, se mostra aumentado nas larvas alimentadas com azeite (Fig 19F). Além dela, a DGAT ou diacilglicerol aciltransferase, catalisador da última etapa da conversão de DAG em TAG também apresenta um aumento significativo (Fig. 19G).

Figura 19 – Larvas alimentadas com azeite apresentam alterações nos níveis de alguns genes do metabolismo de lipídeos.



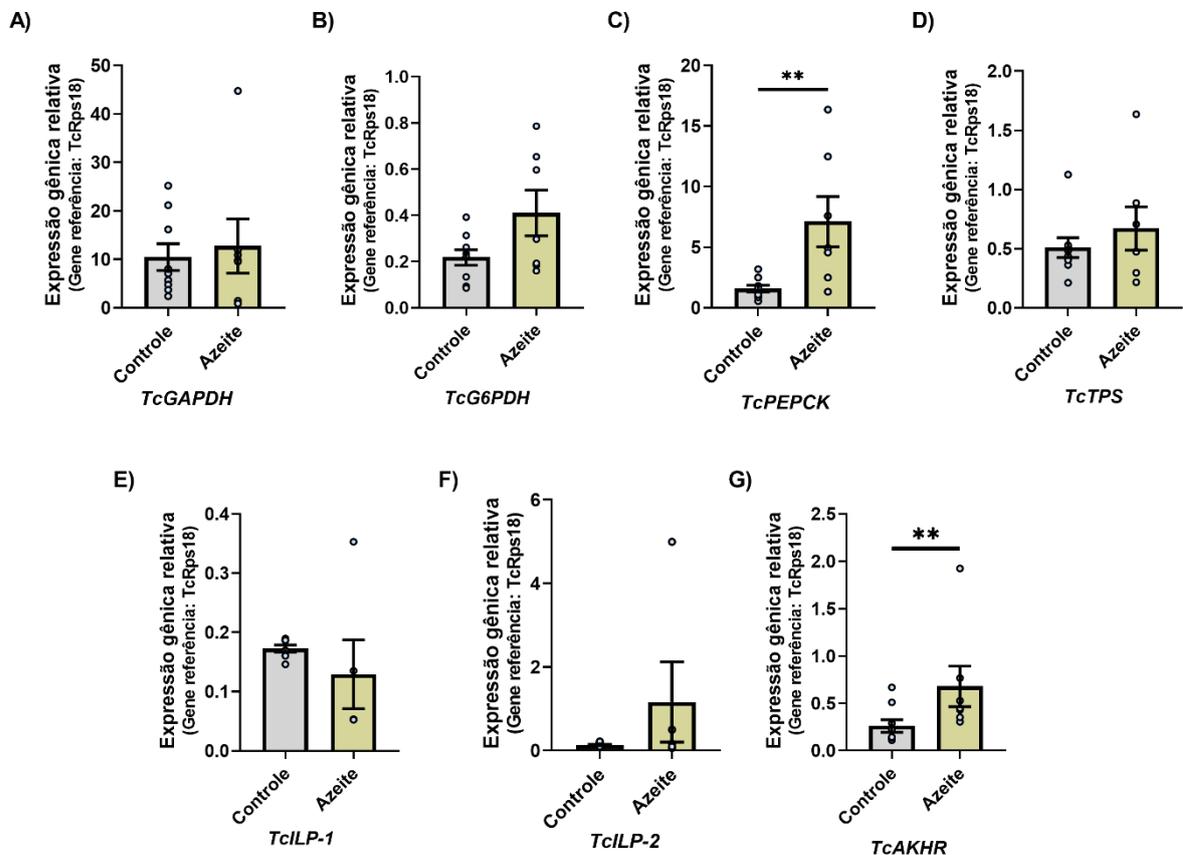
Legenda: Larvas de 5 milímetros de *Tribolium castaneum* foram coletadas, homogeneizadas em Trizol e o RNA total foi extraído. As amostras foram tratadas com DNase I e cDNA foi sintetizado. O PCR quantitativo foi realizado com primers especificamente desenhados para os genes alvos. A amplificação do gene TcRPS18 foi utilizado como controle. As barras representam a média \pm erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. **A) TcACC**, $n \geq 7$, teste Mann-Whitney, $p = 0,6806$; **B) TcACLY**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,9464$; **C) TcACSL4**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,8476$; **D) TcACSL5**, $n \geq 4$, teste t não pareado, $p = 0,1554$; **E) TcBmm**, $n \geq 7$, teste Mann-Whitney, $p = 0,5360$; **F) TcCPT-1**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,0191$; **G) TcDGAT**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,0046$; **H) TcFAS**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,0707$.

Fonte: O autor, 2024.

Com relação ao metabolismo de carboidratos, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase ou PEPCK, enzima da gliconeogênese responsável pela catálise de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato e dióxido de carbono, apresenta um aumento significativo frente às larvas da alimentação controle (Fig. 20C).

Por fim, o receptor do hormônio adipocinético (AKHR) é o único gene da via de sinalização endócrina do presente estudo que apresenta aumento significativo em larvas alimentadas com HFD (Fig. 20G).

Figura 20 – Larvas alimentadas com azeite apresentam alteração em um gene relacionado ao metabolismo de carboidratos e sinalização endócrina.



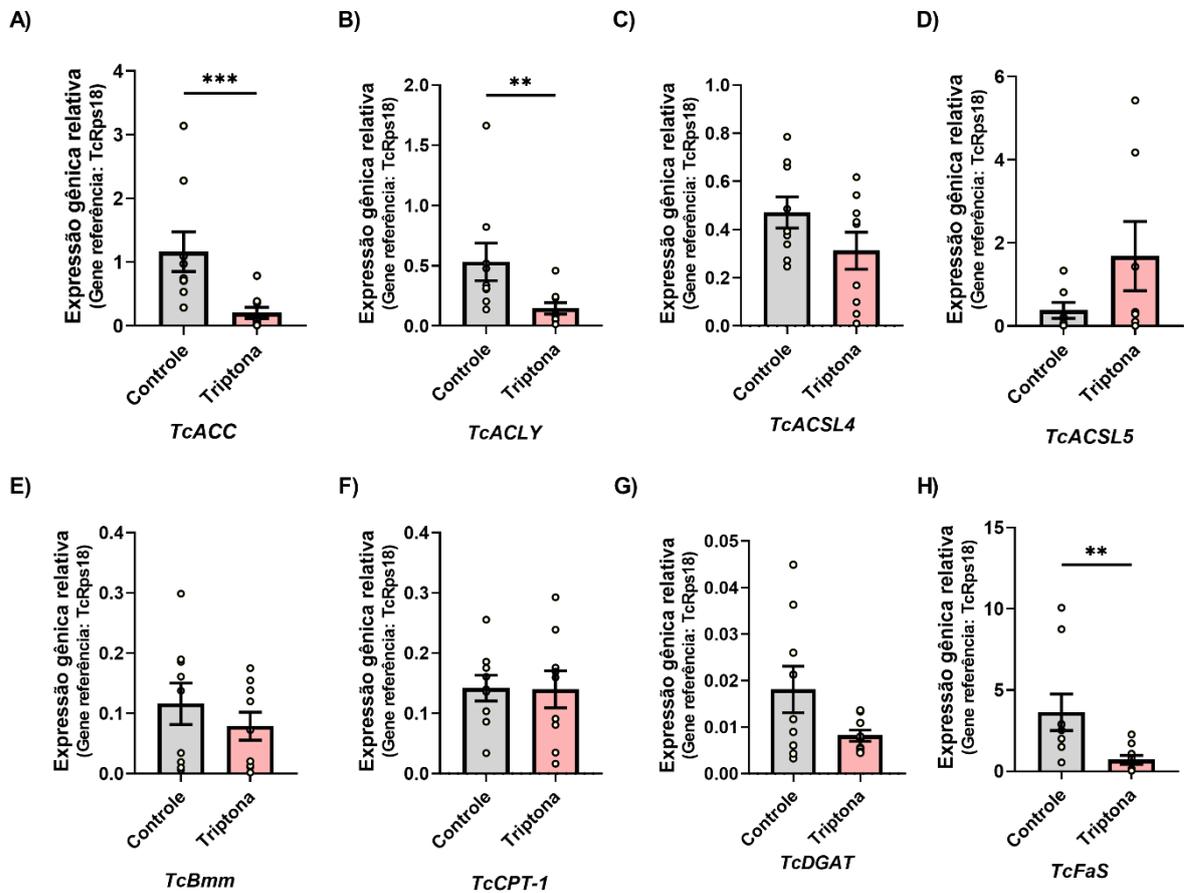
Legenda: Larvas de 5 milímetros de *Tribolium castaneum* foram coletadas, homogeneizadas em Trizol e o RNA total foi extraído. As amostras foram tratadas com DNase I e cDNA foi sintetizado. O PCR quantitativo foi realizado com primers especificamente desenhados para os genes alvos. A amplificação do gene TcRPS18 foi utilizado como controle. As barras representam a média \pm erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. **A) TcGAPDH**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,7927$; **B) TcG6PDH**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,0843$; **C) TcPEPCK**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,0023$, **D) TcTPS**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,5686$; **E) TcILP-1**, $n \geq 5$, teste t não pareado com correção de Welch, $p = 0,1819$; **F) TcILP-2**, $n \geq 5$, teste t não pareado com correção de Welch, $p = 0,3511$; **G) TcAKHR**, $n \geq 7$, teste t não pareado, $p = 0,0097$.

Fonte: O autor, 2024.

Os níveis relativos de RNAm de alguns genes também foram avaliados em larvas de *T. castaneum* submetidas a uma alimentação rica em proteína (Fig. 21-22).

Com relação ao metabolismo de lipídeos no inseto, a suplementação com triptona parece promover a diminuição na expressão de alguns genes que estão interligados com a via anabólica dos ácidos graxos. Genes como acetil-CoA carboxilase, ATP citrato-liase e ácido graxo sintase (FAS) foram alvos da HPD (Fig. 21 A-B, H).

Figura 21 – Larvas alimentadas com triptona apresentam alterações em genes do metabolismo lipídico.

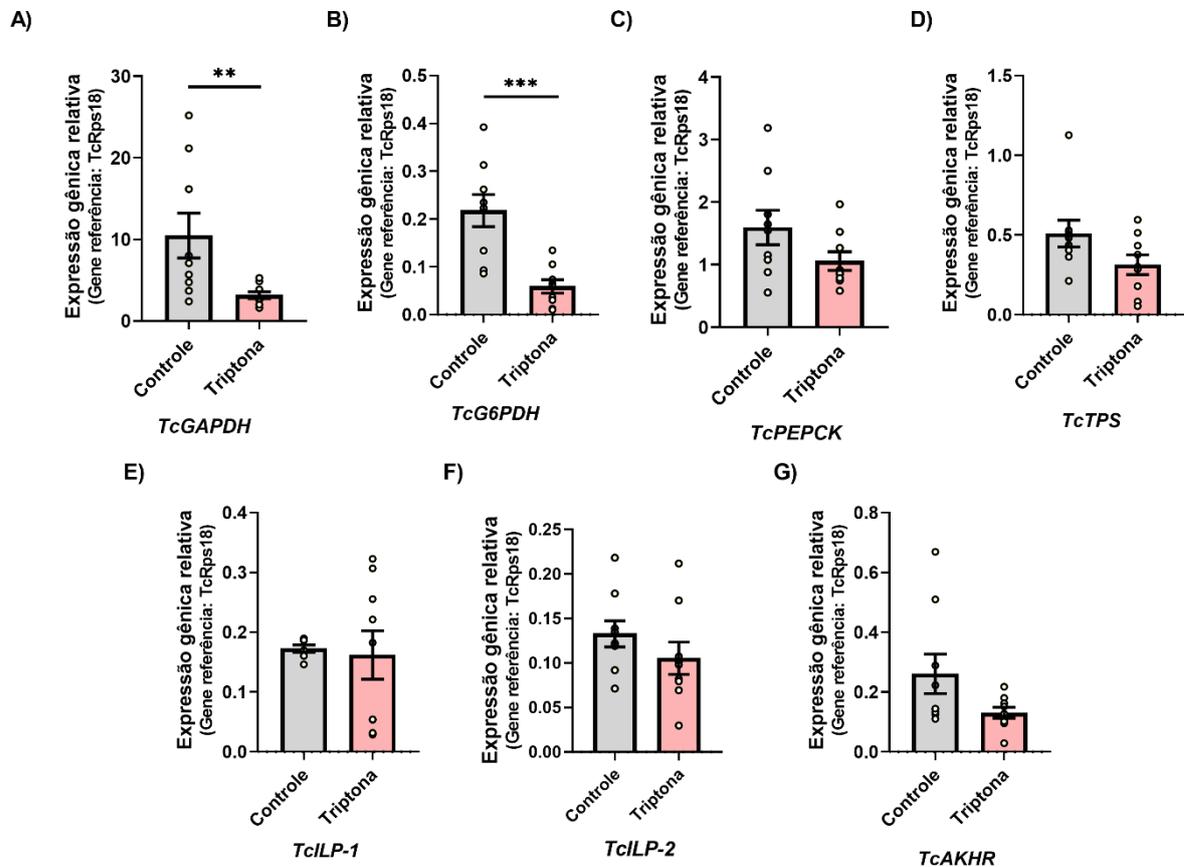


Legenda: Larvas de 5 milímetros de *Tribolium castaneum* foram coletadas, homogêneas em Trizol e o RNA total foi extraído. As amostras foram tratadas com DNase I e cDNA foi sintetizado. O PCR quantitativo foi realizado com primers especificamente desenhados para os genes alvos. A amplificação do gene TcRPS18 foi utilizado como controle. As barras representam a média \pm erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. A) TcACC, n = 9, teste t não pareado, p = 0,0005; B) TcACLY, n = 9, teste t não pareado, p = 0,0034; C) TcACSL4, n = 9, teste t não pareado com correção de Welch, p = 0,1062; D) TcACSL5, n = 7, teste t não pareado, p = 0,3104; E) TcBmm, n = 9; teste t não pareado, p = 0,5398; F) TcCPT-1, n = 9; teste t não pareado, p = 0,6156; G) TcDGAT, n = 9, teste t não pareado com correção de Welch, p = 0,1593; H) TcFAS, n = 9; teste t não pareado, p = 0,0023.

Fonte: O autor, 2024.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), enzima da glicólise e gliconeoênese, e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), ligada ao processo de quebra de carboidratos para produção de NADPH a serem utilizados na síntese de ácidos graxos, são os dois genes que apresentam uma diminuição em suas expressões relativas em larvas alimentadas com HPD (Fig. 22 A-B). Já os genes relacionados à via de sinalização endócrina permanecem inalterados pela dieta (Fig. 22 E-G).

Figura 22 – Larvas alimentadas com triptona apresentam alterações em genes do metabolismo de carboidratos.



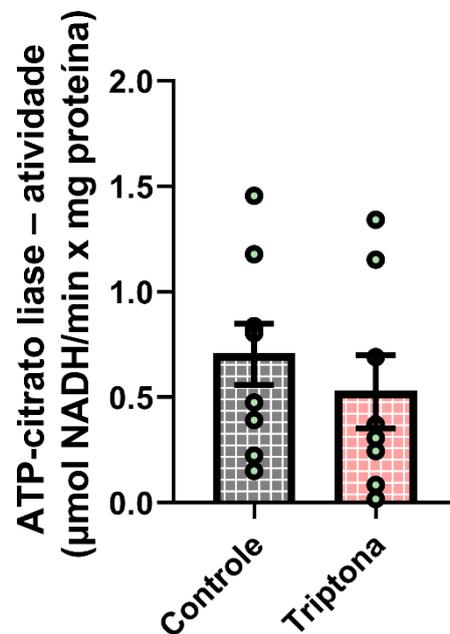
Legenda: Larvas de 5 milímetros de *Tribolium castaneum* foram coletadas, homogeneizadas em Trizol e o RNA total foi extraído. As amostras foram tratadas com DNase I e cDNA foi sintetizado. O PCR quantitativo foi realizado com primers especificamente desenhados para os genes alvos. A amplificação do gene TcRPS18 foi utilizado como controle. As barras representam a média ± erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. **A) TcGAPDH**, n = 9, teste t não pareado, p = 0,0046; **B) TcG6PDH**, n = 9, teste t não pareado, p = 0,0005; **C) TcPEPCK**, n = 9, teste t não pareado, p = 0,1212; **D) TcTPS**, n = 9, teste t não pareado, p = 0,0592; **E) TcILP-1**, n ≥ 7, teste t não pareado com correção de Welch, p = 0,2334; **F) TcILP-2**, n = 9, teste t não pareado, p = 0,1723; **G) TcAKHR**, n = 9, teste Mann-Whitney, p = 0,1135.

Fonte: O autor, 2024.

3.3. A atividade da ATP-citrato liase em larvas de alimentação hiperproteica

Com a diferença observada na expressão gênica da ATP-citrato liase, um dos genes responsáveis pela capacidade lipogênica de novo do animal, sua atividade foi medida em larvas alimentadas com dieta rica em proteína. Contudo, apesar da diferença nos níveis relativos de RNAm, a atividade enzimática da ACLY permanece inalterada quando comparada com animais de alimentação padrão de farinha de trigo.

Figura 23 – Larvas alimentadas com triptona não apresentam alterações na atividade enzimática da ATP-citrato liase.



Legenda: Larvas de 5 milímetros de *Tribolium castaneum* foram coletadas e homogeneizadas em solução tampão Tris-HCl. A atividade enzimática foi determinada por uma reação acoplada com malato desidrogenase e oxidação de NADH, $n \geq 8$, teste t não pareado, $p = 0,4405$.

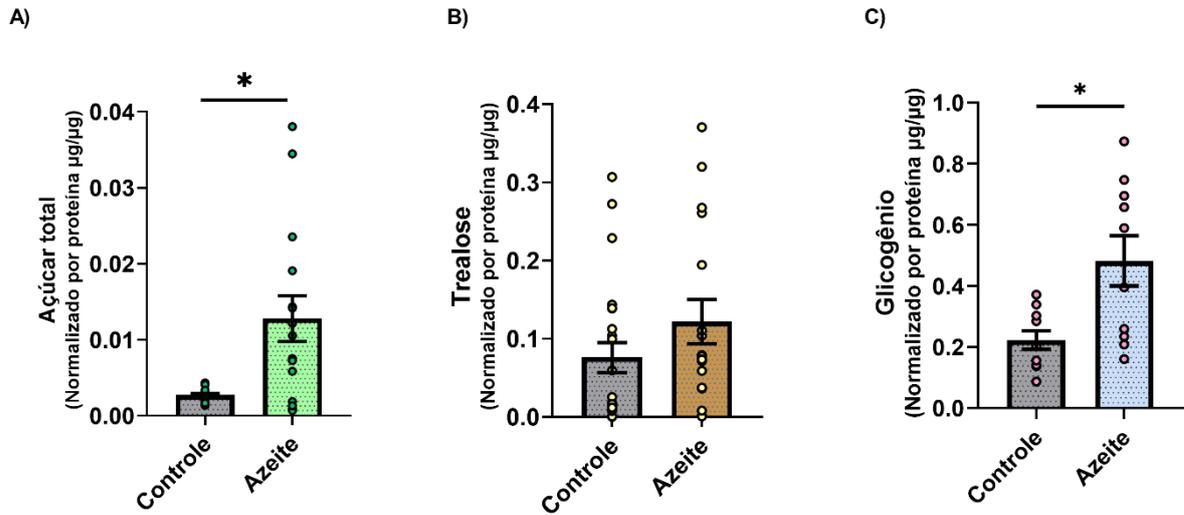
Fonte: O autor, 2024.

3.4. As quantidades de carboidratos totais e glicogênio de larvas são modificadas por dietas hipercalóricas

Com as alterações em diferentes genes do metabolismo do *T. castaneum* e buscando investigar se as dietas hipercalóricas são capazes de alterar a quantidade de carboidrato circulante e os estoques de carboidrato, as quantidades de carboidrato total, trealose e glicogênio foram quantificadas no inseto.

Em animais alimentados com HFD, os níveis do principal carboidrato circulante, trealose, se mostram inalterados (Fig. 24B). Apesar disso, o carboidrato total se mostra significativamente aumentado em comparação aos animais que tiveram uma alimentação controle (Fig. 24A). Curiosamente, o glicogênio também se mostra aumentado nas larvas (Fig. 24C).

Figura 24 – Larvas alimentadas com dieta rica em lipídeo apresentam níveis de carboidrato total e glicogênio aumentados em comparação as larvas controle.

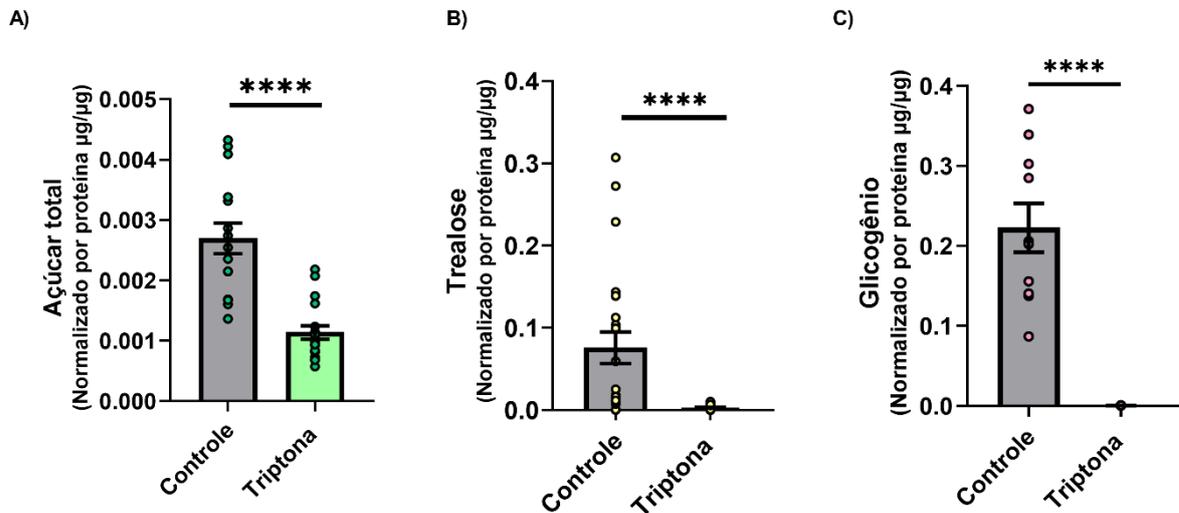


Legenda: Ovos sincronizados de *T. castaneum* foram submetidos à dieta suplementada com azeite, e larvas de 5 mm foram coletadas para contagem e homogeneizadas em tampão salino juntamente de sulfato de sódio 4%. A quantidade de carboidrato total, trealose e glicose foi medida por meio da reação pelo reagente antrona, e normalizado pela quantidade de proteína pelo método de Lowry. As barras representam a média \pm erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. **A) Carboidrato total**, $n = 15$, teste de Mann-Whitney, $p = 0,0186$. **B) Trealose**, $n \geq 17$, teste de Mann-Whitney, $p = 0,2009$; **C) Glicogênio**, $n = 10$, teste t não pareado com correção de Welch, $p = 0,0125$.

Fonte: O autor, 2024

Por outro lado, os animais alimentados com HPD apresentaram uma diminuição nos níveis de carboidratos quando comparadas as larvas com alimentação controle. Os níveis de carboidrato total e trealose estão diminuídos (Fig. 25A-B). Os níveis de reservas energéticas também aparecem bem menores tratando-se de glicogênio (Fig. 25C).

Figura 25 – Larvas alimentadas com dieta rica em proteína apresentam uma diminuição nos níveis de carboidratos quando comparadas com larvas de dietas controle.



Legenda: Ovos sincronizados de *T. castaneum* foram submetidos à dieta suplementada com triptona, e larvas de 5 mm foram coletadas para contagem e homogeneizadas em tampão salino juntamente de sulfato de sódio 4%. A quantidade de carboidrato total, trealose e glicose foi medida por meio da reação pelo reagente antrona, e normalizado pela quantidade de proteína pelo método de Lowry. As barras representam a média \pm erro padrão (EP), e cada ponto representa uma amostra. **A) Carboidrato total**, $n \geq 15$, teste de Mann-Whitney, $p < 0,0001$; **B) Trealose**, $n \geq 23$, teste de Mann-Whitney, $p < 0,0001$; **C) Glicogênio**, $n \geq 9$, teste t não pareado com correção de Welch, $p < 0,0001$.

Fonte: O autor, 2024.

3.5. Perfil transcriptômico de larvas HFD

O perfil transcriptômico de larvas alimentadas com dieta rica em azeite foi investigado. Como muitos métodos estatísticos exploratórios não funcionam muito bem com dados de RNA-seq devido à alta variância esperada, algumas estratégias são adotadas. A transformação de estabilização de variância (VST) é uma transformação essencial mais rápida e menos sensível a valores discrepantes. Esse método torna os dados mais homogêneos, ideal para calcular a distância entre as amostras. Uma abordagem utilizada para visualizar as distâncias entre as amostras é a construção de Análise de Componentes Principais (PCA). Os eixos x e y representam as direções que explicam a maior parte da variação, conhecidas como PC1 e PC2. Com esse gráfico 2D, é possível verificar que as amostras controle (biológicas) e azeite (condições) estão afastadas, não havendo correlação entre si, formando grupos independentes (Fig. 26A).

Após uma análise genética abarcando um total de 11.255 genes, um subconjunto de genes foi categorizado sendo diferencialmente expressos (DEGs) onde suas expressões

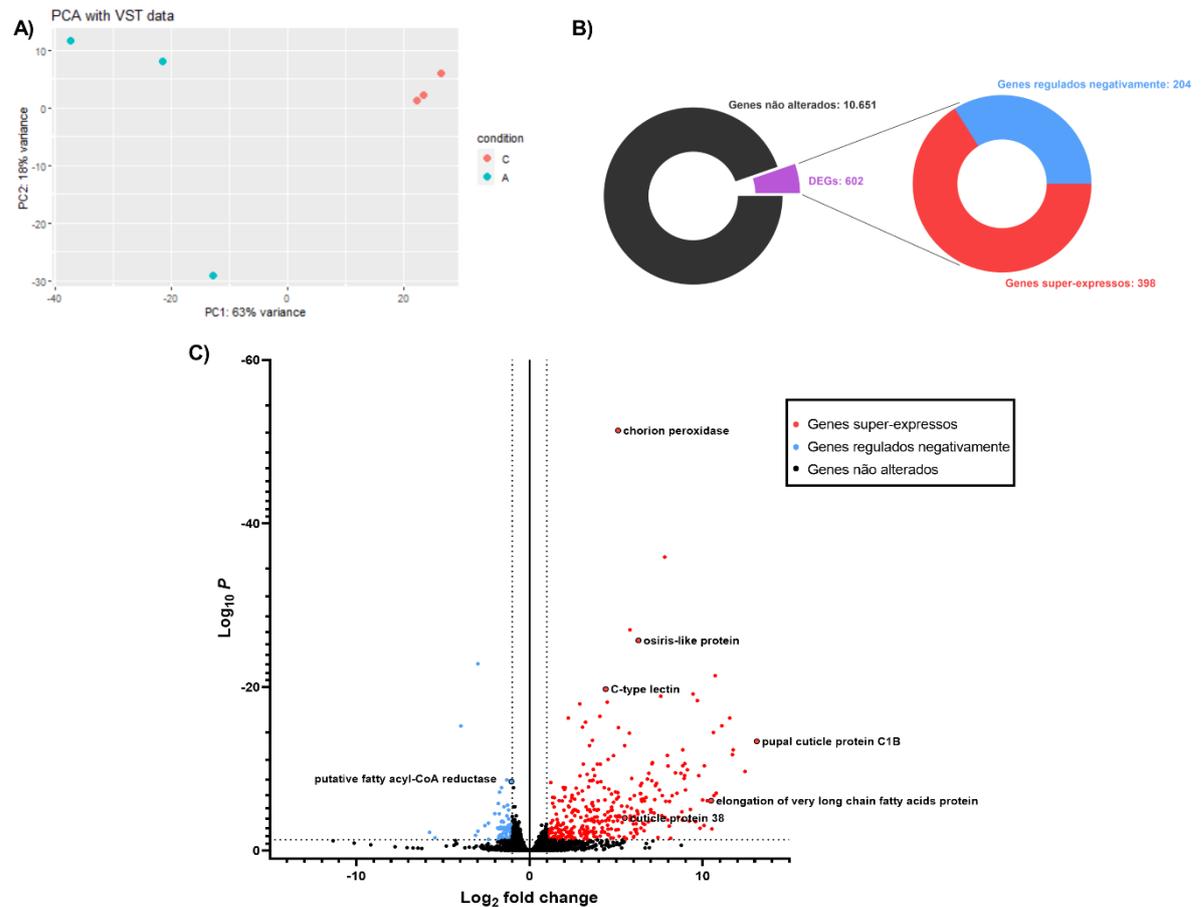
variam significativamente entre as condições. Dito isso, 398 genes se mostraram super regulados e 204 estavam sub regulados (Fig. 26B).

Dando continuidade à investigação dos dados transcriptômicos, um *Volcano plot* foi esquematizado a fim de visualizar os genes com expressões significativas. Para isso, dois modelos de cortes – denominados cutoffs – foram utilizados: a) pCutoff, onde há um corte no valor de p ($10e-17$); e b) FCcutoff, onde FC refere-se à alteração na expressão. Como seu corte foi definido sendo 1, genes com alteração mínima de 2 vezes na expressão (para cima ou para baixo) foram selecionados. Logo, o *Volcano plot* abaixo destaca os genes que atendem aos critérios estabelecidos acima, facilitando, assim, a visualização dos genes mais significativos no estudo de RNA-seq (Fig. 26C). Dentre eles, destaca-se a proteína Lectina do tipo C (LOC660573), que se liga a carboidratos de maneira cálcio-dependente e desempenha diversos papéis em processos biológicos, tais como imunidade e sinalização celular; e a proteína semelhante a Osiris, ligada diretamente ao desenvolvimento do animal. O ID e o nome dos demais genes presentes no *Volcano plot* estão tabelados abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 – ID e nome dos genes destacados no

<i>GeneID</i>	<i>Nome do gene</i>
LOC654965	Elongase de ácidos graxos de cadeias muito longas
LOC661466	Acil-CoA redutase putativa
LOC660719	Cório peroxidase
LOC660573	Lectina do tipo C
658856	Proteína da cutícula pupal C1B
MFK3-12	Proteína cuticular 38
655464	Proteína semelhante a Osiris

Figura 26 – Perfil transcriptômico de larvas *high-fat diet*: PCA, DEGs e *Volcano plot*.



Legenda: Ovos sincronizados de *T. castaneum* foram submetidos a dieta suplementada com azeite, e larvas de 5 mm foram coletadas para RNA-seq. A) Análise de Componentes Principais; B) Genes diferencialmente expressos; C) *Volcano plot* com os genes mais significativamente expressos.

Fonte: TAVARES, M.P.S, Brito, M.W.D.; Mesquita, R. D., 2024.

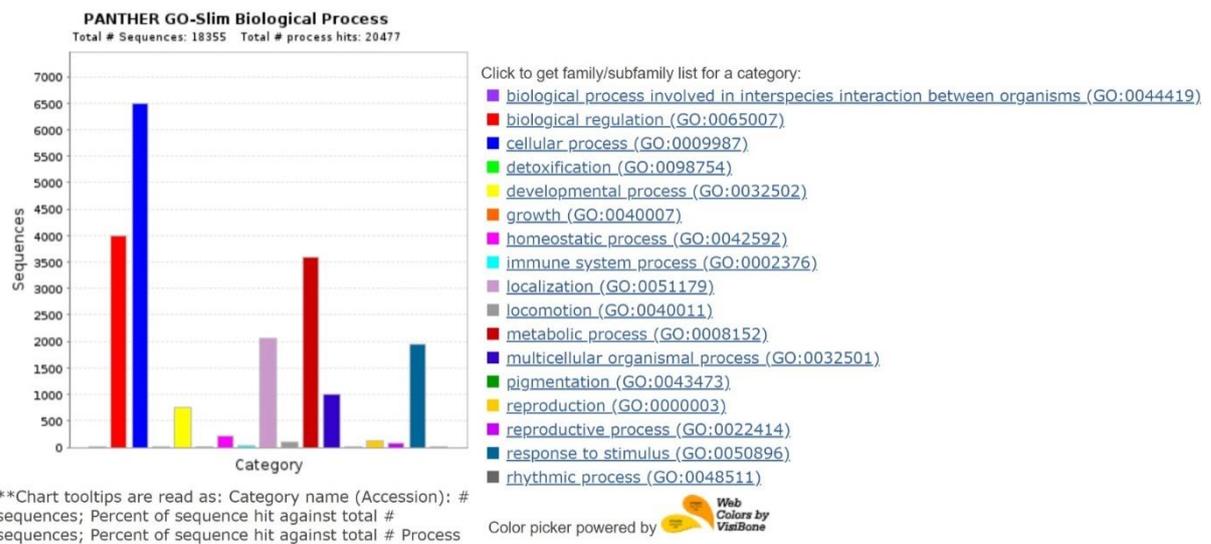
3.5.1. *Gene Ontology*

A anotação gênica é um processo fundamental para a biologia molecular e genômica, exercendo um papel crucial na identificação, caracterização e compreensão dos genes presentes em um organismo. Diante desse contexto, os genes identificados no RNA-seq e que atendiam aos critérios de seleção (*fold change* igual a 1 e valor de taxa de descoberta menor que 0,05) foram selecionados e, utilizando a plataforma PantherDB, uma lista de categorias da *Gene Ontology* foi gerada. Os genes foram agrupados em categorias como processos biológicos, componentes celulares, função molecular e classe de proteínas.

No que se diz respeito aos processos biológicos, os genes selecionados se encaixam principalmente em três subcategorias de classificações da *GO*: 1) processos celulares,

referindo-se a todo e qualquer processo que ocorre dentro da célula, como metabolismo e divisão celular, por exemplo; 2) regulação biológica, onde os sistemas biológicos controlam e coordenam as atividades internas para manter o equilíbrio e responder às mudanças ambientais; e 3) processos metabólicos, estando diretamente interligado a uma série de reações bioquímicas responsáveis pela conversão de nutrientes em energia utilizável para crescimento, reparo e manutenção celular (Fig. 27).

Figura 27 – Gráfico de subcategorias de processos biológicos da *Gene Ontology*.

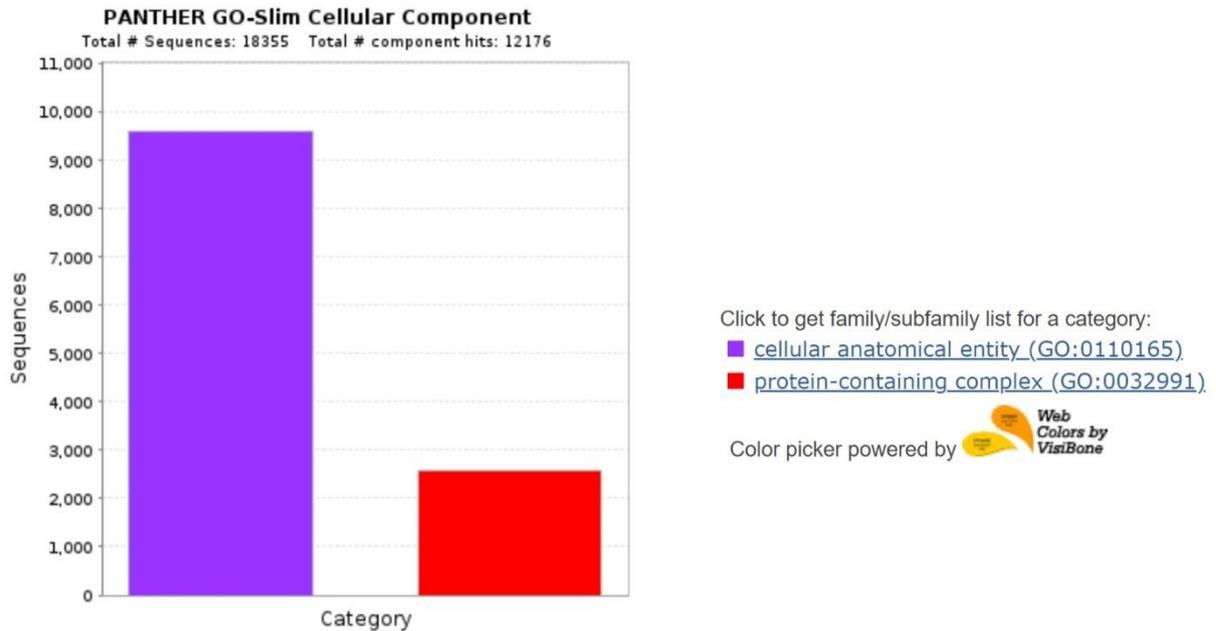


Legenda: **Roxo** – processos biológicos envolvidos na interação entre espécies de organismos; **Vermelho** – regulação biológica; **Azul-escuro** – processos celulares; **Verde-claro** – detoxificação; **Amarelo** – processos de desenvolvimento; **Laranja** – crescimento; **Rosa** – processo homeostático; **Azul-claro** – processos do sistema imune; **Rosa-claro** – localização; **Cinza-claro** – locomoção; **Grená** – processos metabólicos; **Violeta** – processo organismal multicelular; **Verde-escuro** – pigmentação; **Amarelo-escuro** – reprodução; **Rosa-escuro** – processos reprodutivos; **Azul-petróleo** – resposta à estímulos; **Cinza-escuro** – processos rítmicos.

Fonte: M.P.S, Brito, M.W.D.; Mesquita, R. D., 2024.

Tratando-se dos componentes celulares, duas subcategorias de classificação se destacam: 1) entidade anatômica celular, que é definido como qualquer substância produzida por um organismo celular com granularidade acima do nível de complexo de proteínas, mas abaixo do nível de um sistema anatômico; e 2) complexo contendo proteínas, referindo-se a um conjunto de proteínas que interagem entre si a fim de formar um complexo funcional. Grande parte dos genes identificados no estudo do RNA-seq se encaixam na primeira subcategoria descrita (Fig. 28).

Figura 28 – Gráfico de subcategorias de componentes celulares da *Gene Ontology*.



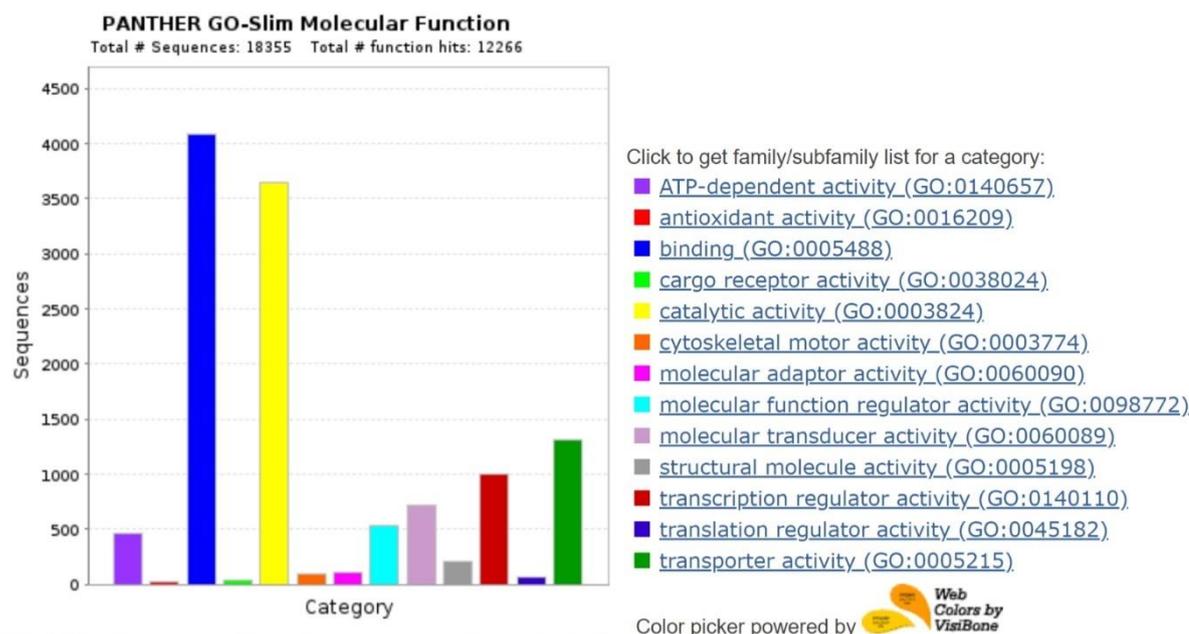
*Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # sequences; Percent of sequence hit against total # sequences; Percent of sequence hit against total # Component hits

Legenda: **Roxo** – entidade anatômica celular; **Vermelho** – complexo contendo proteínas.

Fonte: M.P.S, Brito, M.W.D.; Mesquita, R. D., 2024.

Dois subfamílias das funções moleculares se destacam por abrigar a grande maioria dos genes destacados pelo estudo transcriptômico: *binding* ou ligação e atividade catalítica. Na primeira subfamília, destacam-se os genes capazes de sintetizar proteínas de ligação, sendo essas responsáveis por se ligarem a um sítio específico de outra molécula através de forças intermoleculares. Já a segunda subfamília abarca os genes que sintetizam enzimas, moléculas capazes de acelerar uma reação química, o que facilita a conversão de um substrato em produto (Fig. 29).

Figura 29 – Gráfico de subcategorias de funções moleculares da *Gene Ontology*.



**Chart tooltips are read as: Category name (Accession): # sequences; Percent of sequence hit against total # sequences; Percent of sequence hit against total # Function hits

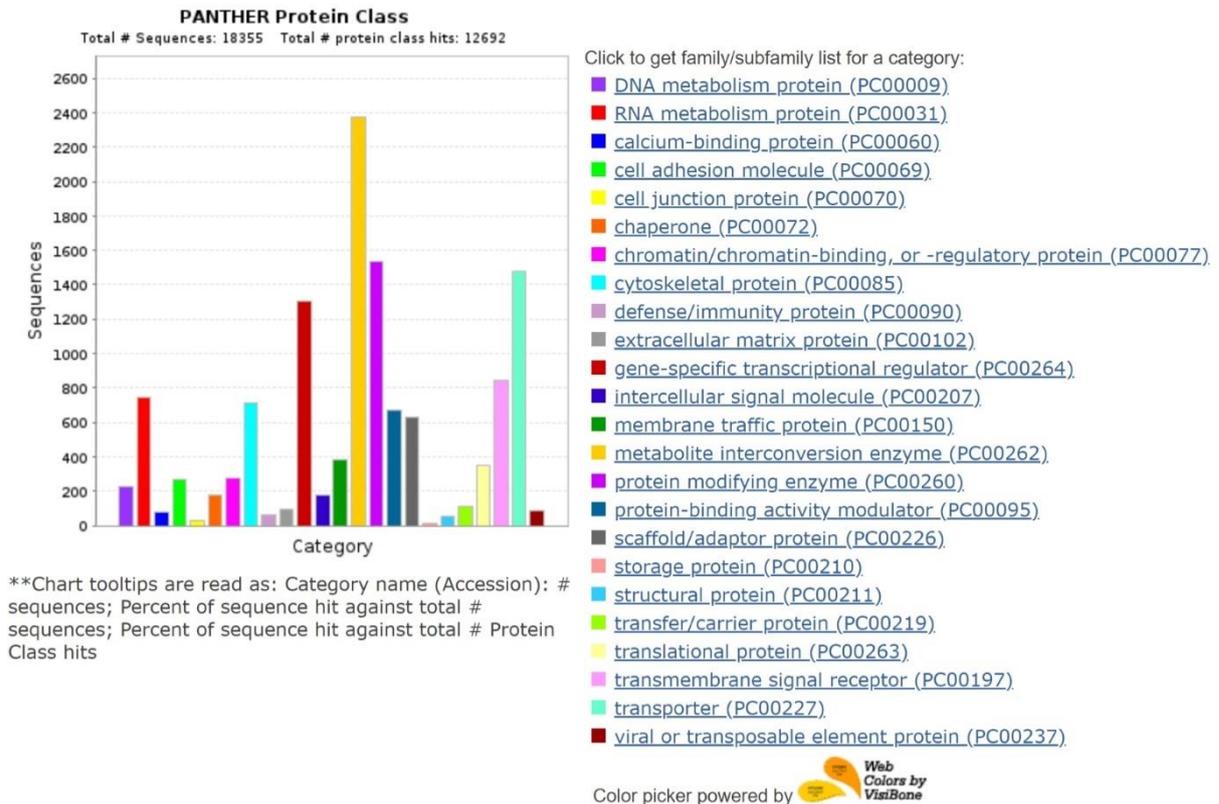
Legenda: **Lilás** – atividade dependente de ATP; **Vermelho** – atividade antioxidante; **Azul** – *binding* ou ligação; **Verde-claro** – atividade de receptor de carga; **Amarelo** – atividade catalítica; **Laranja** – atividade motora citoesquelética; **Rosa** – atividade de adaptador molecular; **Azul-claro** – atividade reguladora da função molecular; **Rosa-claro** – atividade transdutora molecular; **Cinza** – atividade de molécula estrutural; **Grená** – atividade reguladora de transcrição; **Azul-escuro** – atividade reguladora de tradução; **Verde-escuro** – atividade de transporte.

Fonte: M.P.S, Brito, M.W.D.; Mesquita, R. D., 2024.

Por fim, os genes selecionados também foram relacionados com subfamílias de classes de proteínas. Dentre as vinte quatro subfamílias presentes na anotação gênica, quatro delas se sobressaem ao conter a maior parte dos genes. A primeira subclasse é denominada enzimas de interconversão de metabólitos, no qual agrupa enzimas responsáveis por catalisar reações bioquímicas envolvidas na conversão de um metabólito em outro. Esse conjunto de enzimas é importante para a regulação dos níveis de substâncias dentro das células e para o equilíbrio homeostático. Em segundo lugar, a subclasse mais relacionada aos genes é a classe de enzimas modificadoras de proteínas. Elas são responsáveis por modificar proteínas através da adição ou remoção de grupamentos químicos específicos, tais como fosfatos, acetilas, metilas, etc. Em terceiro lugar destaca-se o grupo de proteínas transportadoras, proteínas membranares que facilitam o transporte de íons, moléculas pequenas e outras substâncias através da membrana plasmática ou membrana de organelas intracelulares, papel importantíssimo na regulação do meio intracelular, no funcionamento celular e na homeostase do organismo. Por fim, dentre os grupos mais aparentes, em quarto lugar fica a classe de proteínas reguladoras da transcrição

específica de genes. Estas são proteínas responsáveis por regular a expressão de um gene específico, ativando ou inibindo sua transcrição em resposta aos sinais celulares ou ambientais (Fig. 30).

Figura 30 – Gráfico de subcategorias de classes de proteínas da *Gene Ontology*.



Legenda: **Roxo** – proteínas do metabolismo de DNA; **Vermelho** – proteínas do metabolismo de RNA; **Azul-escuro** – proteínas de ligação a cálcio; **Verde-claro** – molécula de adesão celular; **Amarelo** – proteína de junção celular; **Laranja** – chaperonas; **Rosa** – proteínas regulatórias ou de ligação a cromatina; **Azul-claro** – proteína citoesquelética; **Rosa-claro** – proteínas de defesa; **Cinza-claro** – proteínas da matriz extracelular; **Vermelho-escuro** – proteínas reguladoras da transcrição de genes específicos; **Azul-escuro** – molécula sinalizadora molecular; **Verde-escuro** – proteínas de tráfego de membranas; **Amarelo-escuro** – enzimas de interconversão de metabólitos; **Rosa-escuro** – enzima modificadora de proteínas; **Azul-petróleo** – modulador da atividade de ligação de proteínas; **Cinza-escuro** – proteína adaptora; **Salmão** – proteína de armazenamento; **Azul-ciano** – proteína estrutural; **Verde-limão** – proteína carreadora; **Amarelo-claro** – proteína tradutora; **Lilás-claro** – receptor de sinal transmembrana; **Azul-bebê** – transportador; **Marrom** – proteína de elemento viral ou transponível.

Fonte: M.P.S, Brito, M.W.D.; Mesquita, R. D., 2024.

4 DISCUSSÃO

A obesidade, inquestionavelmente, é um grande problema de saúde pública mundial, visto que já atinge mais de 2 bilhões de pessoas ao redor do globo. A grande problemática por trás dessa doença deve-se ao fato de o acúmulo de lipídeo visceral ser um grande fator de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas não comunicáveis, como diabetes do tipo II, doenças cardiovasculares e câncer (ZHANG *et al.*, 2023). No Brasil, a crescente nas taxas de sobrepeso e obesidade estão intimamente ligadas ao aumento no consumo de gorduras saturadas, carboidratos, refrigerantes e macronutrientes no geral e uma deficiência no consumo de vitaminas e minerais. Logo, conclui-se que as políticas públicas para conter o avanço da obesidade não foram eficazes (WATANABE *et al.*, 2022).

No campo da pesquisa, para investigar os efeitos da composição dietética, macronutrientes e alimentação, os insetos são um modelo muito utilizado para mimetizar doenças metabólicas, especialmente a *D. melanogaster*. Tanto a HFD quanto a HSD se mostraram eficazes em induzir obesidade, hiperglicemia e fenótipos semelhantes a diabetes na mosca, além de disfunções cardíacas; bem como também causaram perturbações na microbiota intestinal da abelha *A. mellifera* (BIRSE *et al.*, 2010; MUSSELMAN *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2021; EICKELBERG *et al.*, 2022). Com relação às HPDs, estudos se apresentam de forma contraditória, dependendo da espécie que é submetida ao tratamento. Em sua grande maioria, estudos apontam que HPD parece diminuir a longevidade da *D. melanogaster*, acelerar o catabolismo lipídico, contribuindo pra redução das gotículas de lipídeos e aumentar a postura de ovos; enquanto que no *Teleogryllus commodus*, comumente conhecido como grilo do campo preto, a composição proteica da dieta aumenta o peso e acelera o desenvolvimento das fêmeas (HUNT *et al.*, 2004; YURKEVYCH *et al.*, 2021; ZANCO *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2022). Com a *D. melanogaster* já estabelecida como um modelo para estudo de doenças metabólicas e com cerca de 60 % dos seus genes apresentando ortólogos em mamíferos (STAATS *et al.*, 2018), esse projeto se propôs a estabelecer o *T. castaneum* como um modelo para estudo de obesidade e suas comorbidades ao investigar quais são os possíveis efeitos que dietas hipercalóricas podem causar na sua fisiologia e no seu metabolismo lipídico. O animal, apesar de ser amplamente utilizado em áreas da genética e do desenvolvimento, possui seu metabolismo pouco explorado.

Alguns pontos explicam o motivo da escolha das larvas de 5 milímetros para esse estudo, ou seja, seu tamanho máximo antes de passar para a próxima fase metamórfica, a pupa.

Em 2011, ao trabalhar com a *D. melanogaster*, Musselman e colaboradores já preconizavam que larvas são animais em constante alimentação, crescimento e em processo de estocagem energética. Todos esses processos são regulados pela sinalização da insulina. Devido ao processo metamórfico e aos citados anteriormente, a alimentação das larvas é mais confiável que em adultos. Pensando em uma perspectiva de insetos e similaridades, o mesmo vale para o *T. castaneum* que também é um inseto holometábolo.

Inicialmente, para investigar se o animal acumula TAG através da alimentação tal qual mamíferos, como já observado na *D. melanogaster*, os insetos foram alimentados com diferentes fontes e concentrações de carboidratos, lipídeos e proteína. Musselman *et al.*, 2011 demonstrou que larvas da mosca alimentadas com dieta rica em carboidrato apresentam fenótipos relacionados à obesidade e que mimetizam a diabetes do tipo II. Estudos mais recentes, como o de Nunes e Andrade-Barbosa, 2023, confirmam o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina e, além disso, as moscas fêmeas produzem menos ovos, dos quais muitos não eclodem. Além da *Drosophila*, Hou *et al.*, 2024 estabeleceu as larvas de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) como modelo para estudo de diabetes, e a alimentação rica em carboidrato as fez apresentar fenótipos obesos e diabéticos. Se tratando das larvas de *T. castaneum*, as mesmas não apresentaram diferenças em seus estoques de lipídeo em nenhuma das concentrações das duas fontes de carboidratos testadas, sacarose e glicose, o que não nos fez investigar outros parâmetros que pudessem ser afetados pela dieta. Por ser uma praga agrícola de grãos armazenados, sendo eles basicamente ricos em amido, sugere-se que a adição de mais carboidratos na alimentação do besouro não seja capaz de causar perturbações metabólicas.

Continuando os testes com as dietas hipercalóricas, a alimentação com diferentes concentrações de triptona foi a próxima a ser testada. Como já descrito na literatura, os resultados apresentam variações de acordo com as espécies que são submetidas às alimentações com proteína, podendo haver aumento do peso corporal ou aceleração do metabolismo lipídico. Nesse projeto, as larvas do coleóptero alimentadas com dieta suplementada com triptona não apresentaram alterações na sua composição corporal. Contudo, olhando o gráfico, parece haver uma tendência ao aumento de TAG na concentração de 10% de triptona peso/volume. Além dessa observação, a falta de dados na literatura acerca do metabolismo do *T. castaneum* e de dietas proteicas no mesmo nos fez continuar averiguando quais outros efeitos poderiam ser causados por essa alimentação. Outros parâmetros observados dizem respeito a expressão relativa de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, carboidratos e sinalização

endócrina, além da quantificação de carboidratos e glicogênio, e a atividade enzimática da ATP-citrato liase, uma das enzimas da via de síntese de novo de ácidos graxos.

Com relação à expressão gênica, genes responsáveis pela síntese de ácidos graxos estão diminuídos em animais alimentados com triptona, como ACC e FAS, conversores de acetil-CoA em malonil-CoA e malonil-CoA em acil-CoA, respectivamente (BATES *et al.*, 2020; GÜNENC *et al.*, 2022). Além desses, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), responsável por desviar intermediários da glicólise para a via das pentose-fosfato (STANTON, 2012), e ATP-citrato liase, que catalisa a conversão de citrato em acetil-CoA para a biossíntese de ácidos graxos (ICARD *et al.*, 2020) também estão reduzidos, ambos interligados com a lipogênese de novo. Apesar da expressão gênica estar diminuída, o mesmo não é visto na atividade enzimática da ACLY, logo, sugere-se que, apesar da diminuição nos níveis transcricionais, a proteína ainda consegue manter sua atividade inalterada. Mais experimentos são necessários para confirmar esse quadro. Por fim, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, catalisador da conversão de gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-bifosfoglicerato na presença de NAD⁺ e fosfato inorgânico (NICHOLLS *et al.*, 2012), também diminuiu, sugerindo uma diminuição na quebra de moléculas de glicose. Os níveis de carboidrato total, trealose e as reservas de glicogênio diminuídos não corroboram com o último achado. A expressão de genes ligados à degradação de lipídeos e sinalização endócrina como as ILPs e AKH não parecem ser afetados pela alimentação. Esses resultados em conjunto parecem sugerir que, apesar de haver um aumento na quantidade de TAG com suplementação de 10 % de proteína, a triptona parece diminuir os níveis de carboidratos e a síntese de ácidos graxos nas larvas do *T. castaneum*, já que há uma diminuição também na ingestão de amido proveniente da dieta feita puramente de farinha de trigo. Todavia, Yurkevych *et al.*, 2020 demonstrou que as moscas alimentadas com proteína apresentam um aumento de 36% nos níveis de trealose, e também nos níveis de glicogênio, o que vai de contramão aos resultados desse projeto; mostrando mais uma vez que os trabalhos com dietas ricas em proteínas apresentam variação de acordo com a espécie estudada. Trazendo para uma perspectiva de alimentação humana, dietas hiperproteicas a curto prazo, em comparação com dietas ricas em carboidratos, parecem promover uma maior perda de peso juntamente de uma melhora na resposta insulínica e diminuição da glicemia, reduzindo as chances de acometimento de diabetes do tipo II e/ou doenças cardiovasculares (TETTAMANZI *et al.*, 2021). Os benefícios da dieta hiperproteica ligados à perda de peso estão relacionados à saciedade, devido ao aumento da secreção de GLP-1 e redução na secreção do hormônio da fome, grelina. Porém, em 2014, Pesta & Samuel destacaram que a alta ingestão de aminoácidos de cadeia ramificada, juntamente de uma alimentação ocidentalizada, pode agravar o quadro

de Síndrome Metabólica. Em condições de baixa demanda energética, o consumo exacerbado de proteínas pode levar à síntese de glicose via gliconeogênese ou formação de corpos cetônicos, contribuindo para o aumento na ingestão calórica e, conseqüentemente, no ganho de peso.

A literatura descreve que, em mamíferos, a ingestão de ácidos graxos saturados é responsável por ativar a via de sinalização de TLR4, uma das principais vias responsáveis por desencadear a resposta inflamatória induzida pela obesidade (ROGERO E CALDER, 2018), e uma diminuição no consumo desse tipo de lipídeos é essencial para frear também o acometimento de doenças cardiovasculares ao diminuir as concentrações de colesterol LDL (SIRI-TARINO *et al.*, 2010). Por outro lado, ácidos graxos poli-insaturados ou monoinsaturados apresentam propriedades anti-inflamatórias, o que acarreta na diminuição da via de TLR4 e no quadro de inflamação (ROGERO E CALDER, 2018). Devido aos fatos anteriormente mencionados, duas fontes de lipídeos diferentes foram utilizadas para suplementar a dieta das larvas de *T. castaneum* e observar quais fenótipos os animais apresentariam: gema de ovo em pó, rica em ácidos graxos saturados, e azeite, contendo ácidos graxos monoinsaturados.

Larvas de 5 milímetros de *T. castaneum* que foram alimentadas com gema de ovo em pó não apresentaram alterações em seus conteúdos de TAG em nenhuma das concentrações testadas. Porém foi observado um atraso no desenvolvimento larval e na quantidade de animais coletados no vigésimo primeiro dia de alimentação, onde animais da dieta controle já haviam atingido seu tamanho máximo antes de empupar. De certa maneira, esses achados são diferentes aos resultados publicados anteriormente por Moura-Silva *et al.*, onde as larvas recém eclodidas alimentadas com gema de ovo apresentaram aumento na sua composição de TAG e aceleração do seu desenvolvimento. Sugere-se que essa diferença possa ser explicada pelos diferentes tamanhos, estágios larvais e as necessidades metabólicas e energéticas dos animais de cada projeto.

Como os ácidos graxos provenientes de fontes vegetais são insaturados e geralmente se apresentam sob a forma de óleos, a mistura do azeite com a farinha de trigo não se apresenta de maneira homogênea em maiores concentrações da HFD. Dito isso, apenas a concentração de 5 % de azeite foi considerada para a quantificação de TAG e tal condição foi suficiente para verificarmos um aumento na composição de estoque de TAG do animal. Apesar de ambas as dietas testadas serem compostas por lipídeos, algumas hipóteses podem explicar a diferença no fenótipo obeso observado em animais alimentados com azeite: a gema de ovo em pó tem uma combinação de ácidos graxos saturados, insaturados, mono insaturados e poli-insaturados,

enquanto que o azeite apresenta majoritariamente ácidos graxos monoinsaturados. Outro fator importante é que a gema de ovo em pó também é rica em proteínas e carboidratos, enquanto que o azeite é composto de 98%-99% de triacilgliceróis (GORZYNIK-DEBICKA *et al.*, 2018; XIAL *et al.*, 2020). Em 2021, ao testar HFDs com diferentes ácidos graxos na alimentação de abelhas, Wang *et al* sugeriu que a abundância relativa de ácidos graxos na composição das dietas influencia o tipo de fenótipo a ser observado, estando acompanhado de alterações na microbiota do animal. Apesar da quantificação de TAG ter sido feita apenas com a concentração de 5 %, foi observado também um atraso no desenvolvimento larval e na quantidade de larvas coletadas no vigésimo primeiro dia de alimentação em concentrações de até 15% tal qual larvas da dieta com gema de ovo em pó.

A expressão gênica dos mesmos genes dos animais alimentados com triptona foram investigados nas larvas suplementadas com azeite depois de observamos a alteração no conteúdo de triacilglicerol dos mesmos. Com relação ao metabolismo de lipídeos, notamos um aumento considerável na expressão de CPT-1, enzima chave de regulação da β -oxidação (SCHLAEPFER & JOSHI, 2020), sugerindo que a principal via catabólica de lipídeos está aumentada nesses animais. Em contrapartida, a DGAT, enzima que catalisa a etapa final da conversão de diacilglicerol em triacilglicerol (SHARMA & WOLFRUM, 2023), também se encontra altamente expressa, portanto, esse aumento explica o aumento na composição de TAG observado nas larvas alimentadas com dieta suplementada com azeite. Dois genes que também apresentam suas expressões aumentadas são a PEPCCK, enzima ligada a síntese de glicose via gliconeogênese (MARTINS DA SILVA *et al.*, 2023), e AKHR, análogo ao glucagon de mamíferos e responsável por mobilizar reservas energéticas e manter os níveis de glicose na hemolinfa (LI *et al.*, 2023). Além da análise da expressão gênica, também foi realizada a quantificação de carboidrato total, trealose e glicogênio, revelando um aumento na quantidade de carboidrato total e, contraditoriamente, de glicogênio. Esses achados juntos sugerem um fenótipo hiperglicêmico e diabético, onde a falta de glicose dentro das células leva o animal a aumentar a via lipolítica a fim de suprir suas demandas energéticas. O aumento dos níveis de glicogênio, apesar de não esperado, mostra ser um dado interessante, sendo necessário mais estudos investigativos para explicar o motivo pelo qual as suas reservas se apresentam aumentadas.

O atraso no desenvolvimento larval tanto em animais alimentados com gema de ovo em pó quanto azeite pode estar ligado a um impacto direto na cascata de sinalização da insulina, que também possui a mesma via da IGF-1 (do inglês *insulin growth-factor 1*), impactando diretamente em processos de envelhecimento (ALTINTAS *et al.*, 2016). Apesar de não vermos

diferença nos níveis de expressão de dois dos peptídeos similares à insulina, sugere-se que outros peptídeos similares à insulina, não investigados nesse trabalho, podem ter sido afetados pelas dietas a níveis pós-tradução, havendo um prejuízo direto na fosforilação de AKT. Quantificar os níveis de fosforilação de AKT por *Western blotting* pode nos dar uma ideia do quão prejudicada a via metabólica da insulina pode estar devido à HFD.

Todos os resultados obtidos nos experimentos com as larvas desafiadas por uma dieta suplementada com azeite contribuíram para a geração de dados transcriptômicos. Isso permitiu uma visão mais abrangente das alterações genéticas induzidas pelo tratamento, indo além dos genes que inicialmente eram alvo de nossa investigação. Dos 11.255 genes investigados no estudo, 602 demonstraram alterações, com a maioria apresentando super-regulação. Graças às ferramentas bioinformáticas, pudemos destacar dados importantes em nosso estudo: a Análise de Componentes Principais (PCA) permitiu constatar uma baixa relação entre as variáveis, sendo eles grupos independentes. Essa análise ajudou a diminuir qualquer redundância dos dados antes de agrupá-los, além de certificar a qualidade das amostras. A visualização 2D das variáveis nos permitiu observar se as amostras com condições biológicas semelhantes se agrupavam e se as amostras com condições distintas se afastavam uma das outras.

Em seguida, com a montagem do *volcano plot*, pudemos destacar genes com maior taxa de expressão e separá-los, graficamente, em super expressos e sub-expressos. Como dito anteriormente, o estudo transcriptômico permitiu a análise de genes para além dos nossos candidatos. Logo, foi possível notar que muitos dos genes super-regulados são responsáveis por regular processos cuticulares, de desenvolvimento e imunidade inata. Além da Lectina do tipo C citada anteriormente, destaca-se a Osiris 19 que, de acordo com a literatura, a família desse gene parece estar envolvida no processo de formação de cutícula e defesas do inseto, o que corrobora com os achados do RNAseq onde muitos genes relacionados à cutícula se mostram superexpressos. Também é descrito que os genes dessa família apresentam papéis importantes no desenvolvimento do animal, no fenótipo de plasticidade e respostas de imunidade e toxicidade, o que nos permite prever seu papel central na adaptação evolutiva dos insetos (SMITH *et al.*, 2018). Com relação aos lipídeos, genes de elongases de ácidos graxos de cadeia longa se mostram superexpressos, dados na literatura sugerem que as elongases apresentam papel importante na reprodução e no desenvolvimento do *T. castaneum* (XUE *et al.*, 2023). Dito isso, investigações mais específicas sobre o papel das elongases pode nos descrever melhor sua importância na fisiologia do *T. castaneum*.

Em resumo, dados valiosos puderam ser extraídos dos dados transcriptômicos desse projeto e, além disso, a anotação gênica nos permitiu visualizar graficamente os genes que

foram diferencialmente expressos, categorizá-los de acordo com suas funções e observar quais são as vias e funções biológicas alteradas no coleóptero *T. castaneum*. Além disso, novos alvos gênicos podem ser trabalhados para investigar quais fenótipos podem ser observados no animal alimentado com uma dieta rica em lipídeo. Entretanto, mesmo tendo seu genoma completamente sequenciado, muitos dos seus genes foram anotados como não caracterizados ou são genes preditos, o que acaba por tornar o estudo transcriptômico levemente limitado.

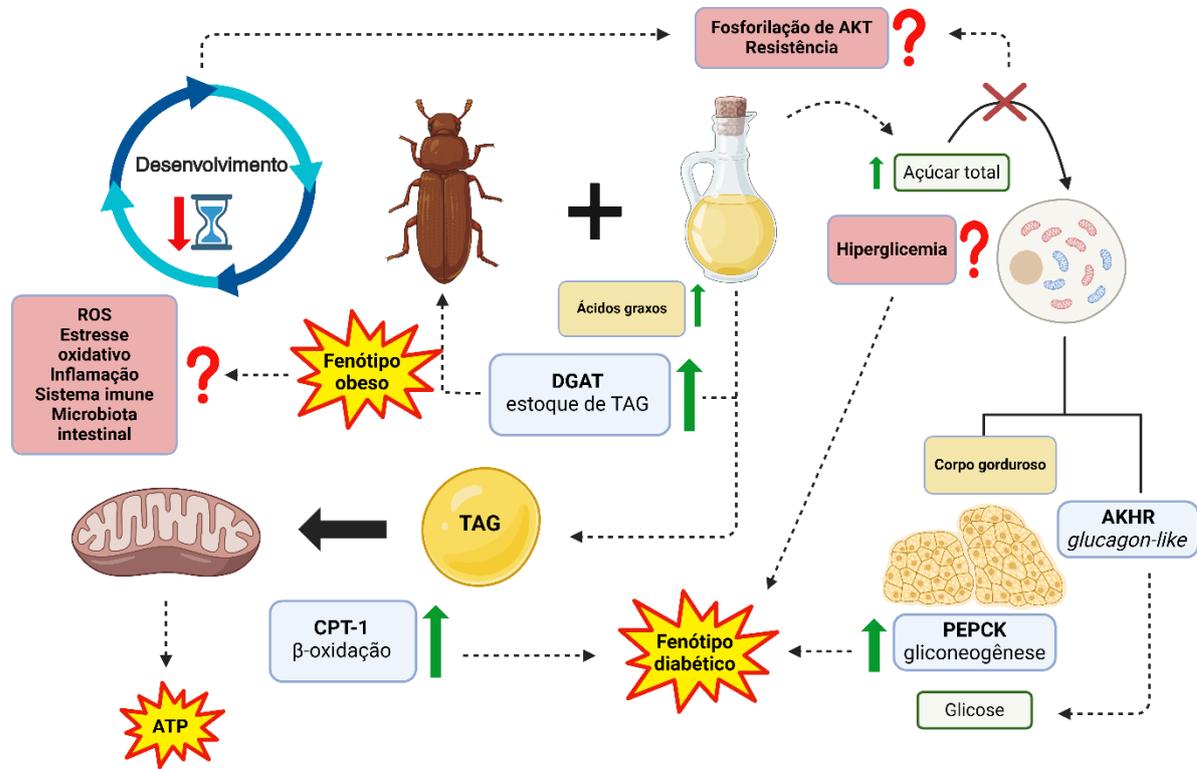
CONCLUSÃO

A suplementação alimentar com diversas fontes calóricas nos permitiu observar importantes resultados e fenótipos no metabolismo e fisiologia do besouro *T. castaneum*, o que nos permitiu iniciar o estabelecimento do inseto como modelo para estudo de doenças metabólicas.

Diversos trabalhos desafiando insetos a HFD demonstram alterações que se assemelham aos fenótipos observados em indivíduos obesos e diabéticos, tais como: hiperglicemia, alterações cardiovasculares, resistência à insulina, alterações na microbiota intestinal e redução da fertilidade (BIRSE *et al.*; 2011; MUSSELMAN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2021; SALGADO-CANALES *et al.*, 2023).

Apesar de poucos dados estarem disponíveis na literatura utilizando o *T. castaneum* para estudo de doenças metabólicas, o mesmo mostra-se um modelo experimental promissor ao responder metabolicamente às dietas hipercalóricas, em especial, à dieta rica em lipídeos. Em conjunto, nossos dados demonstram que a suplementação da dieta do besouro com azeite parece induzir fenótipos que mimetizam a obesidade e o diabetes do tipo II em humanos. Contudo, mais estudos investigativos são necessários para que o modelo seja completamente estabelecido. Experimentos envolvendo resposta imunológica à dieta, alterações na microbiota intestinal, oviposição, taxa de sobrevivência, problemas cardiovasculares, estresse oxidativo e respiração mitocondrial podem nos dar respostas-chave para entendermos como a dieta modula a resposta metabólica do inseto, da mesma maneira que a obesidade afeta os mamíferos em uma escala sistêmica.

Figura 31 – Representação esquemática dos principais efeitos causados pela dieta hiperlipídica e possíveis respostas metabólicas em escala sistêmica.



Legenda: O aumento nos níveis de carboidratos totais e lipídeos, oxidação de ácidos graxos e sinalização de glucagon nos mostra possíveis fenótipos obeso e diabético no animal. Parâmetros que podem estar sendo afetados pela dieta englobam a produção de espécies reativas do oxigênio, respostas imunológicas e inflamação, a microbiota intestinal e atividade mitocondrial.

Fonte: O autor, 2024.

REFERÊNCIAS

ABE, Maiko; KAMIYAMA, Takumi; IZUMI, Yasushi; QIAN, Qingyin; YOSHIHASHI, Yuma; DEGAWA, Yousuke; WATANABE, Kaori; HATTORI, Yukako; UEMURA, Tadashi; NIWA, Ryusuke. Shortened lifespan induced by a high-glucose diet is associated with intestinal immune dysfunction in *Drosophila sechellia*. **Journal Of Experimental Biology**, [S.L.], v. 225, n. 21, p. 1-13, 31 out. 2022. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.244423>

ADEVA-ANDANY, María M.; CARNEIRO-FREIRE, Natalia; SECO-FILGUEIRA, Mónica; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, Carlos; MOURIÑO-BAYOLO, David. Mitochondrial β -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, [S.L.], v. 46, p. 73-90, maio 2019. **Elsevier BV**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.009>

ALTINTAS, Ozlem; PARK, Sangsoon; LEE, Seung-Jae V.. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. **Bmb Reports**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 81-92, 29 fev. 2016. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology - BMB Reports. <http://dx.doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.2.261>

ARRESE, Estela L.; SOULAGES, Jose L.. Insect Fat Body: energy, metabolism, and regulation. **Annual Review Of Entomology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 207-225, 1 jan. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>

ATELLA, G. C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. Capítulo 6: Metabolismo de Lipídeos. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2012

AZEEZ, Odunayo Ibraheem; MEINTJES, Roy; CHAMUNORWA, Joseph Panashe. Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-13, 23 abr. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511x-13-71>

BATES, Jamie; VIJAYAKUMAR, Archana; GHOSHAL, Sarani; MARCHAND, Bruno; YI, Saily; KORNYEYEV, Dmytro; ZAGORSKA, Anna; HOLLENBACK, David; WALKER, Katie; LIU, Kathy. Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell activation. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 73, n. 4, p. 896-905, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.037>

BELLUCO, Simone; BERTOLA, Michela; MONTARSI, Fabrizio; MARTINO, Guido di; GRANATO, Anna; STELLA, Roberto; MARTINELLO, Marianna; BORDIN, Fulvio; MUTINELLI, Franco. Insects and Public Health: an overview. **Insects**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 240, 27 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/insects14030240>

BIRSE, Ryan T.; CHOI, Joan; REARDON, Kathryn; RODRIGUEZ, Jessica; GRAHAM, Suzanne; DIOP, Soda; OCORR, Karen; BODMER, Rolf; OLDHAM, Sean. High-Fat-Diet-Induced Obesity and Heart Dysfunction Are Regulated by the TOR Pathway in *Drosophila*. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 533-544, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.014>

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. Canadian **Journal Of Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 37, n. 8, p. 911-917, 1 ago. 1959. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/o59-099>

BURLANDY, Luciene; ALEXANDRE-WEISS, Veruska Prado; CANELLA, Daniela Silva; SILVA, Ana Carolina Feldenheimer da; CARVALHO, Camila Maranha Paes de; CASTRO, Inês Rugani Ribeiro de. Obesity agenda in Brazil, conflicts of interest and corporate activity. **Health Promotion International**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 1186-1197, 10 nov. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/heapro/daaa085>

CHOWANSKI, Szymon; ADAMSKI, Zbigniew; LUBAWY, Jan; MARCINIAK, Pawel; PACHOLSKA-BOGALSKA, Joanna; SLOCINSKA, Malgorzata; SPOCHACZ, Marta; SZYMCZAK, Monika; URBANSKI, Arkadiusz; WALKOWIAK-NOWICKA, Karolina. Insect Peptides - Perspectives in Human Diseases Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 24, n. 29, p. 3116-3152, 4 out. 2017. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/0929867324666170526120218>

EICKELBERG, Virginia; LÜERSEN, Kai; STAATS, Stefanie; RIMBACH, Gerald. Phenotyping of *Drosophila melanogaster*—A Nutritional Perspective. **Biomolecules**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 221, 27 jan. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom12020221>

FAGUNDES, Djalma José; TAHA, Murched Omar. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 59-65, jan. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502004000100010>

FREIRE, Camilla. **Metabolismo de lipídeos em inseto coleóptero: digestão e transporte de ácidos graxos**. 2018. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

GARCIA, Geovana S.; OTHONICAR, Murilo F.; OLIVEIRA, Marcos T.; COUTO-LIMA, Carlos A.. An Affordable and Efficient "Homemade" Platform for *Drosophila* Behavioral Studies, and an Accompanying Protocol for Larval Mitochondrial Respirometry. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 175, p. 1-10, 24 set. 2021. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/62669>

GONDIM, K. C.; ATELLA, G. C.; PONTES, E. G.; MAJEROWICZ, D. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 101, p. 108–123, 2018

GORZYNIK-DEBICKA, Monika; PRZYCHODZEN, Paulina; CAPPELLO, Francesco; KUBAN-JANKOWSKA, Alicja; GAMMAZZA, Antonella Marino; KNAP, Narcyz; WOZNIAK, Michal; GORSKA-PONIKOWSKA, Magdalena. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 686, 28 fev. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19030686>

GRÖNKE, Sebastian; MILDNER, Alexander; FELLERT, Sonja; TENNAGELS, Norbert; PETRY, Stefan; MÜLLER, Günter; JÄCKLE, Herbert; KÜHNLEIN, Ronald P.. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. **Cell Metabolism**, [S.L.], v. 1, n. 5, p. 323-330, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2005.04.003>

GRÜNWALD, Stefanie; ADAM, Iris V.; GURMAI, Ana-Maria; BAUER, Ludmila; BOLL, Michael; WENZEL, Uwe. The Red Flour Beetle *Tribolium castaneum* as a Model to Monitor Food Safety and Functionality. **Advances In Biochemical Engineering/Biotechnology**, [S.L.], p. 111-122, 2013. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/10_2013_212

GUERRA, Inês M. S.; FERREIRA, Helena B.; MELO, Tânia; ROCHA, Hugo; MOREIRA, Sónia; DIOGO, Luísa; DOMINGUES, Maria Rosário; MOREIRA, Ana S. P.. Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation Disorders: from disease to lipidomic studies.: a critical review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 22, p. 13933, 11 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232213933>

GÜNENC, Aybeg N.; GRAF, Benjamin; STARK, Holger; CHARI, Ashwin. Fatty Acid Synthase: structure, function, and regulation. **Subcellular Biochemistry**, [S.L.], p. 1-33, 2022. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-00793-4_1

HERNDON, Nicolae; SHELTON, Jennifer; GERISCHER, Lizzy; IOANNIDIS, Panos; NINOVA, Maria; DÖNITZ, Jürgen; WATERHOUSE, Robert M.; LIANG, Chun; DAMM, Carsten; SIEMANOWSKI, Janna. Enhanced genome assembly and a new official gene set for *Tribolium castaneum*. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-13, 14 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-019-6394-6>

HOFFMAN, Alan 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* L. **Lipids**, [S.L.], v. 14, n. 11, p. 893-899, nov. 1979. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02533502>

HOU, Jiaming; TAN, Cheng; CHEN, Nan; ZHOU, Yuan; HUANG, Shaojun; CHEN, Huani; QIAN, Li. Establishment of diabetes mellitus model using *Bombyx mori* silkworms in a low-temperature environment. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 115, n. 1, p. 1-11, jan. 2024. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.22083>

HUNT, John; BROOKS, Robert; JENNIONS, Michael D.; SMITH, Michael J.; BENTSEN, Caroline L.; BUSSIÈRE, Luc F.. High-quality male field crickets invest heavily in sexual display but die young. **Nature**, [S.L.], v. 432, n. 7020, p. 1024-1027, dez. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03084>

ICARD, Philippe; WU, Zherui; FOURNEL, Ludovic; COQUEREL, Antoine; LINCET, Hubert; ALIFANO, Marco. ATP citrate lyase: a central metabolic enzyme in cancer. **Cancer Letters**, [S.L.], v. 471, p. 125-134, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.010>

IMAMURA, Fumiaki; FRETTS, Amanda M.; MARKLUND, Matti; KORAT, Andres V. Ardisson; YANG, Wei-Sin; LANKINEN, Maria; QURESHI, Waqas; HELMER, Catherine; CHEN, Tzu-An; VIRTANEN, Jyrki K.. Fatty acids in the de novo lipogenesis pathway and incidence of type 2 diabetes: a pooled analysis of prospective cohort studies. **Plos Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 1-17, 12 jun. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1003102>

JANG, Hee-Seong; NOH, Mi Ra; KIM, Jinu; PADANILAM, Babu J.. Defective Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Lipotoxicity in Kidney Diseases. **Frontiers In Medicine**, [S.L.], v. 7, p. 1-8, 12 mar. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2020.00065>

JARC, E., & PETAN, T. (2019). Lipid Droplets and the Management of Cellular Stress. **The Yale journal of biology and medicine**, 92(3), 435–452

JIANG, Shu-Zhong; LU, Wen; ZONG, Xue-Feng; RUAN, Hong-Yun; LIU, Yi. Obesity and hypertension. **Experimental And Therapeutic Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 2395-2399, 6 set. 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2016.3667>

KAWAI, Tatsuo; AUTIERI, Michael V.; SCALIA, Rosario. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American Journal Of Physiology-Cell Physiology**, [S.L.], v. 320, n. 3, p. 375-391, 1 mar. 2021. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>

KELLY, Kenneth L.; REAGAN, William J.; SONNENBERG, Gabriele E.; CLASQUIN, Michelle; HALES, Katherine; ASANO, Shoh; AMOR, Paul A.; CARVAJAL-GONZALEZ, Santos; SHIRAI, Norimitsu; MATTHEWS, Marcy D.. De novo lipogenesis is essential for platelet production in humans. **Nature Metabolism**, [S.L.], v. 2, n. 10, p. 1163-1178, 14 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-020-00272-9>

KLINGLER, Martin; BUCHER, Gregor. The red flour beetle *T. castaneum*: elaborate genetic toolkit and unbiased large scale rnai screening to study insect biology and evolution. **Evodevo**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-11, 19 jul. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13227-022-00201-9>

KUMAR, Harshit; PANIGRAHI, Manjit; CHHOTARAY, Supriya; BHANUPRAKASH, V.; SHANDILYA, Rahul; SONWANE, Arvind; BHUSHAN, Bharat. Red flour beetle (*Tribolium castaneum*): from population genetics to functional genomics. **Veterinary World**, [S.L.], p. 1043-1046, ago. 2018. Veterinary World. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2018.1043-1046>

LI, Jiaying; DANG, Peixuan; LI, Zhen; ZHAO, Tujing; CHENG, Daojun; PAN, Dingyu; YUAN, Yufeng; SONG, Wei. Peroxisomal ERK mediates Akh/glucagon action and glycemic control. **Cell Reports**, [S.L.], v. 42, n. 10, p. 113200, out. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113200>

LI, Sheng; YU, Xiaoqiang; FENG, Qili. Fat Body Biology in the Last Decade. **Annual Review Of Entomology**, [S.L.], v. 64, n. 1, p. 315-333, 7 jan. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112007>

LI, Xuebo; YANG, Yongqiang; LI, Genping; LI, Hongwei; WANG, Qingshan; WAN, Lihua. The Effect of Dietary Fat Levels on the Size and Development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: calliphoridae). **Journal Of Insect Science**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1-5, 1 jan. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jisesa/ieu036>

LI, Yajuan; ZHANG, Wenxu; FUNG, Anthony A.; SHI, Lingyan. DO-SRS imaging of diet regulated metabolic activities in *Drosophila* during aging processes. **Aging Cell**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 1-12, 7 mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/accel.13586>

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MILLER, Charlotte V. L.; COTTER, Sheena C.. Resistance and tolerance: the role of nutrients on pathogen dynamics and infection outcomes in an insect host. **Journal Of**

Animal Ecology, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 500-510, nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2656.12763>

MOURA-SILVA, Julia; TAVARES, Matheus P. S.; ALMEIDA-OLIVEIRA, Fernanda; MAJEROWICZ, David. Diet supplementation with egg yolk powder fattens the beetle *Tribolium castaneum*. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 112, n. 4, p. 1-14, 19 jan. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.22000>

MUSSELMAN, Laura Palanker; FINK, Jill L.; NARZINSKI, Kirk; RAMACHANDRAN, Prasanna Venkatesh; HATHIRAMANI, Sumitha Sukumar; CAGAN, Ross L.; BARANSKI, Thomas J.. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. **Disease Models & Mechanisms**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 842-849, 1 nov. 2011. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.007948>

MUSSELMAN, Laura Palanker; KÜHNLEIN, Ronald P.. *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. **Journal Of Experimental Biology**, [S.L.], v. 221, n. 1, p. 1-12, 7 mar. 2018. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.163881>

NASCIMENTO, P. V. P.; ALMEIDA-OLIVEIRA, F.; MACEDO-SILVA, A.; AUSINA, P.; MOTINHA, C.; SOLA-PENNA, M.; MAJEROWICZ, D.. Gene annotation of nuclear receptor superfamily genes in the kissing bug *Rhodnius prolixus* and the effects of 20-hydroxyecdysone on lipid metabolism. **Insect Molecular Biology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 297-314, 29 jan. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imb.12696>

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2014.

NICHOLLS, Craig; LI, He; LIU, Jun-Ping. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. **Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology**, [S.L.], v. 39, n. 8, p. 674-679, 25 jul. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x>

NICHOLLS, Elizabeth; ROSSI, Marta; NIVEN, Jeremy E.. Larval nutrition impacts survival to adulthood, body size and the allometric scaling of metabolic rate in adult honeybees. **Journal Of Experimental Biology**, [S.L.], v. 224, n. 14, p. 1-10, 15 jul. 2021. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.242393>

NUNES, Rodrigo Dutra; DRUMMOND-BARBOSA, Daniela. A high-sugar diet, but not obesity, reduces female fertility in *Drosophila melanogaster*. **Development**, [S.L.], v. 150, n. 20, p. 1-25, 15 out. 2023. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.201769>

PESTA, Dominik H; SAMUEL, Varman T. A high-protein diet for reducing body fat: mechanisms and possible caveats. **Nutrition & Metabolism**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 53, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-11-53>

PICHÉ, Marie-Eve; TCHERNOF, André; DESPRÉS, Jean-Pierre. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. **Circulation Research**, [S.L.], v. 126, n. 11, p. 1477-1500, 22 maio 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.120.316101>

PINHEIRO-CASTRO, Natália; SILVA, Livia Beatriz Aparecida Ribeiro; NOVAES, Gabriela Machado; ONG, Thomas Prates. Hypercaloric Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders in Experimental Models. **Reviews On Biomarker Studies Of Metabolic And Metabolism-Related Disorders**, [S.L.], p. 149-161, 2019. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-12668-1_8

POINTER, Michael D.; GAGE, Matthew J. G.; SPURGIN, Lewis G.. *Tribolium* beetles as a model system in evolution and ecology. **Heredity**, [S.L.], v. 126, n. 6, p. 869-883, 25 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41437-021-00420-1>

REITER, Lawrence T.; POTOCKI, Lorraine; CHIEN, Sam; GRIBSKOV, Michael; BIER, Ethan. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. **Genome Research**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1114-1125, 1 jun. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.169101>

RENWICK, Julie; KAVANAGH, Kevin. Insects as Models for Studying the Virulence of Fungal Pathogens of Humans. **New Insights In Medical Mycology**, [S.L.], p. 45-67, 2007. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6397-8_3

RICHARDS, S *et al.* The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, [S.L.], v. 452, n. 7190, p. 949-955, 23 mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06784>

ROGERO, Marcelo; CALDER, Philip. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients*, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 432, 30 mar. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu10040432>

ROSA-GONÇALVES, Pamela; MAJEROWICZ, David. Pharmacotherapy of Obesity: limits and perspectives. *American Journal Of Cardiovascular Drugs*, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 349-364, 22 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40256-019-00328-6>

RÖSNER, Janin; WELLMAYER, Benedikt; MERZENDORFER, Hans. *Tribolium castaneum*: a model for investigating the mode of action of insecticides and mechanisms of resistance. *Current Pharmaceutical Design*, [S.L.], v. 26, n. 29, p. 3554-3568, 4 set. 2020. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612826666200513113140>

RTVELADZE, Ketevan; MARSH, Tim; WEBBER, Laura; KILPI, Fanny; LEVY, David; CONDE, Wolney; MCPHERSON, Klim; BROWN, Martin. Health and Economic Burden of Obesity in Brazil. *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 1-10, 11 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068785>

SABBÁ, Hanna Benayon Oliveira; VIANA, Caio Antônio Silva; SILVA, Caroline Baía; ALVES, Diogo Ramos; MIRANDA, Jhon Lennon Ferreira; RODRIGUES, Manuella Carneiro; SANTOS, Pedro Henrique Farias dos. Ozempic (Semaglutide) for the treatment of obesity: advantages and disadvantages from an integrative analysis. *Research, Society And Development*, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1, 4 set. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i11.33963>

SALGADO-CANALES, Daniela; QUENTI, Daniela; LOURIDO, Fernanda; CIFUENTES, Mariana; TOBAR, Nicolás. “Effect of time-restricted feeding on high-fat diet-induced metabolic dysfunction in *Drosophila melanogaster*”. *Biochimica Et Biophysica Acta*

(Bba) - **Molecular Basis Of Disease**, [S.L.], v. 1869, n. 6, p. 166749, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166749>

SCHLAEPFER, Isabel R; JOSHI, Molishree. CPT1A-mediated Fat Oxidation, Mechanisms, and Therapeutic Potential. **Endocrinology**, [S.L.], v. 161, n. 2, p. 1-14, 4 jan. 2020. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/endo/bqz046>

SCHOELER, Marc; CAESAR, Robert. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism. **Reviews In Endocrine And Metabolic Disorders**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 461-472, 9 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11154-019-09512-0>

SERRA, Dolors; MERA, Paula; MALANDRINO, Maria Ida; MIR, Joan Francesc; HERRERO, Laura. Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Obesity. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 269-284, 20 jul. 2013. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4875>

SHARMA, Anand Kumar; WOLFRUM, Christian. DGAT inhibition at the post-absorptive phase reduces plasma FA by increasing FA oxidation. **Embo Molecular Medicine**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 1-5, 4 out. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.202318209>

SILVA, Renato Martins da; DAUMAS FILHO, Carlos Renato de Oliveira; CALIXTO, Christiano; SILVA, Jhenifer Nascimento da; LOPES, Cintia; VAZ JUNIOR, Itabajara da Silva; LOGULLO, Carlos. PEPCK and glucose metabolism homeostasis in arthropods. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 160, p. 103986, set. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103986>

SIRI-TARINO, Patty W; SUN, Qi; HU, Frank B; KRAUSS, Ronald M. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 91, n. 3, p. 502-509, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2008.26285>

SOUZA-TAVARES, Henrique; MIRANDA, Carolline Santos; VASQUES-MONTEIRO, Isabela Macedo Lopes; SANDOVAL, Cristian; SANTANA-OLIVEIRA, Daiana Araujo; SILVA-VEIGA, Flavia Maria; FERNANDES-DA-SILVA, Aline; SOUZA-MELLO,

Vanessa. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat metabolic diseases: focus on the adipose tissue, liver, and pancreas. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 29, n. 26, p. 4136-4155, 14 jul. 2023. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v29.i26.4136>

Shadia E. Abd El-Aziz, 2011. Control Strategies of Stored Product Pests. *Journal of Entomology*, 8: 101-122. DOI: [10.3923/je.2011.101.122](https://doi.org/10.3923/je.2011.101.122)

SMITH, C. R.; MORANDIN, C.; NOUREDDINE, M.; PANT, S.. Conserved roles of Osiris genes in insect development, polymorphism and protection. **Journal Of Evolutionary Biology**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 516-529, 2 fev. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/jeb.13238>

SRYGLEY, R.B.; JARONSKI, S.T.. Protein deficiency lowers resistance of Mormon crickets to the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal Of Insect Physiology**, [S.L.], v. 105, p. 40-45, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.01.005>

STAATS, Stefanie; LÜERSEN, Kai; WAGNER, Anika E.; RIMBACH, Gerald. *Drosophila melanogaster* as a Versatile Model Organism in Food and Nutrition Research. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 66, n. 15, p. 3737-3753, 5 abr. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05900>

STANTON, Robert C.. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. **Iubmb Life**, [S.L.], v. 64, n. 5, p. 362-369, 20 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.1017>

TETTAMANZI, Francesca; BAGNARDI, Vincenzo; LOUCA, Panayiotis; NOGAL, Ana; MONTI, Gianna Serafina; MAMBRINI, Sara P.; LUCCHETTI, Elisa; MAESTRINI, Sabrina; MAZZA, Silvia; RODRIGUEZ-MATEOS, Ana. A High Protein Diet Is More Effective in Improving Insulin Resistance and Glycemic Variability Compared to a Mediterranean Diet—A Cross-Over Controlled Inpatient Dietary Study. **Nutrients**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 4380, 7 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13124380>

TONK-RÜGEN, Miray; VILCINSKAS, Andreas; WAGNER, Anika E.. Insect Models in Nutrition Research. **Biomolecules**, [S.L.], v. 12, n. 11, p. 1668, 11 nov. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom12111668>

TOPRAK, Umut. The Role of Peptide Hormones in Insect Lipid Metabolism. **Frontiers In Physiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-33, 7 maio 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.00434>

TOPRAK, Umut; HEGEDUS, Dwayne; DOĞAN, Cansu; GÜNEY, Gözde. A journey into the world of insect lipid metabolism. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 104, n. 2, p. 1-10, 25 abr. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.21682>

TOUTGES, Michelle J.; HARTZER, Kris; LORD, Jeffrey; OPPERT, Brenda. Evaluation of Reference Genes for Quantitative Polymerase Chain Reaction across Life Cycle Stages and Tissue Types of *Tribolium castaneum*. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 58, n. 16, p. 8948-8951, 30 jul. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf101603j>

TSUCHIDA, Kozo; WELLS, Michael 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**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 263-268, jan. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-1790\(88\)90090-x](http://dx.doi.org/10.1016/0020-1790(88)90090-x)

VAN HANDEL, E. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, vol. 1,3 (1985): 299-301

VECCHIÉ, Alessandra; DALLEGRI, Franco; CARBONE, Federico; BONAVENTURA, Aldo; LIBERALE, Luca; PORTINCASA, Piero; FRÜHBECK, Gema; MONTECUCCO, Fabrizio. Obesity phenotypes and their paradoxical association with cardiovascular diseases. **European Journal Of Internal Medicine**, [S.L.], v. 48, p. 6-17, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2017.10.020>

XIAO, Nanhai; ZHAO, Yan; YAO, Yao; WU, Na; XU, Mingsheng; DU, Huaying; TU, Yonggang. Biological Activities of Egg Yolk Lipids: a review. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 68, n. 7, p. 1948-1957, 2 fev. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06616>

XUE, Shuang; GAO, Shanshan; CAO, Yizhuo; GAO, Tian; YIN, Se; ZHANG, Yonglei; LU, Ruixue; ZHANG, Kunpeng. Transcriptome profiling analysis reveals the role of Elongases in development and reproduction of *Tribolium castaneum*. **Journal Of Asia-Pacific Entomology**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 102048, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2023.102048>

WALKOWIAK-NOWICKA, Karolina; CHOWAŃSKI, Szymon; URBAŃSKI, Arkadiusz; MARCINIAK, Paweł. Insects as a New Complex Model in Hormonal Basis of Obesity. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 20, p. 11066, 14 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222011066>

WALLACE, Martina; METALLO, Christian M.. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. **Seminars In Cell & Developmental Biology**, [S.L.], v. 108, p. 65-71, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2020.02.012>

WANG, L.; WANG, S.; LI, Y.; PARADESI, M. S. R.; BROWN, S. J.. BeetleBase: the model organism database for *Tribolium castaneum*. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 35, n. , p. 476-479, 3 jan. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl776>

WATANABE, Ligia M.; NAVARRO, Anderson M.; SEALE, Lucia A.. Intersection between Obesity, Dietary Selenium, and Statin Therapy in Brazil. **Nutrients**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 2027, 12 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13062027>

WATANABE, Ligia Moriguchi; DELFINO, Heitor Bernardes Pereira; PINHEL, Marcela Augusta de Souza; NORONHA, Natália Yumi; DIANI, Luisa Maria; ASSUMPÇÃO, Lucca Cintra do Prado; NICOLETTI, Carolina Ferreira; NONINO, Carla Barbosa. Food and Nutrition Public Policies in Brazil: from malnutrition to obesity. **Nutrients**, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 2472, 15 jun. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu14122472>

World Obesity Federation, World Obesity Atlas 2023.

YURKEVYCH, Ihor S.; GRAY, Lindsey J.; GOSPODARYOV, Dmytro V.; BURDYLYUK, Nadia I.; STOREY, Kenneth B.; SIMPSON, Stephen J.; LUSHCHAK, Oleh. Development of fly tolerance to consuming a high-protein diet requires physiological, metabolic and transcriptional changes. **Biogerontology**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 619-636, 29 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-020-09880-0>

ZANCO, Brooke; MIRTH, Christen K; SGRÒ, Carla M; PIPER, Matthew Dw. A dietary sterol trade-off determines lifespan responses to dietary restriction in *Drosophila melanogaster* females. **Elife**, [S.L.], v. 10, p. 1-20, 26 jan. 2021. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.62335>

ZHANG, Xiang; HA, Suki; LAU, Harry Cheuk-Hay; YU, Jun. Excess body weight: novel insights into its roles in obesity comorbidities. **Seminars In Cancer Biology**, [S.L.], v. 92, p. 16-27, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2023.03.008>

ZHANG, Xinbo; TANG, Naimei; HADDEN, Timothy J.; RISHI, Arun K.. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research**, [S.L.], v. 1813, n. 11, p. 1978-1986, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>

ZHENG, Hao; STEELE, Margaret I.; LEONARD, Sean P.; MOTTA, Erick V. S.; MORAN, Nancy A.. Honey bees as models for gut microbiota research. **Lab Animal**, [S.L.], v. 47, n. 11, p. 317-325, 23 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41684-018-0173-x>