

2.08.04 - Bioquímica / Biologia Molecular

**IMPACTO DO USO DE UM INIBIDOR METABÓLICO NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
TRANSPORTADORAS DE ÁCIDOS GRAXOS E NOS NÍVEIS DE TRIGLICERÍDEOS DO INSETO
*TRIBOLIUM CASTANEUM***

Erika Gilmar Pereira Lira^{1*}, Larissa Costa Santos¹, Luana da Conceição Lopes da Silva¹; Thays Sousa Fontes¹; Camilla Camerino Santana¹; Mariana De Macedo Costa¹; Camila Braga Dornelas¹, Luciano Aparecido Meireles Grillo¹.

1. Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL

Resumo:

Os lipídios são importantes para as funções biológicas de insetos, pois exercem papel destacado na geração de energia metabólica e outros processos celulares. Ácidos graxos de cadeia longa são as principais fontes de energia nas células, sendo ativados por ligação a uma Coenzima A para gerar um Acil-CoA, que é necessário para alongamento de ácidos graxos, síntese de triacilglicerol e beta-oxidação. Estudos a respeito dos processos de digestão e transferência de lipídios entre os diferentes tecidos em insetos são bem conhecidos, no entanto, muito pouco se sabe a respeito do transporte dos produtos de hidrólise dessa digestão. A presença dessas proteínas é essencial no transporte de ácidos graxos de cadeia longa que regulam vários processos metabólicos. Diante dos fatos, objetiva-se avaliar os impactos do uso de inibidores metabólicos e da dieta “high fat” no desenvolvimento do inseto e na expressão de duas proteínas envolvidas com transporte de lipídios no inseto *Tribolium castaneum*.

Palavras-chave: FATP; Orlistate; Metabolismo de lipídeos.

Apoio financeiro: Fapeal, capes e CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL

Introdução:

O *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma praga de culturas como trigo, soja e aveia, que causa grande perda na produção desses cereais e no valor nutricional dos grãos. Dessa forma, a indústria agrícola trata os grãos com produtos químicos para exterminar os insetos, ocasionando acúmulo de substâncias nocivas e de metais no produto que é consumido pela população (BEDNARSKA & STERPIEN, 2015). O estudo de mecanismos biológicos que acontecem no desenvolvimento de insetos tem sido realizado para subsidiar informações que permitam o desenvolvimento de novas formas de controle biológico para insetos-pragas. Estudos com *T. castaneum* resultaram na identificação do genoma deste inseto (RICHARDS, 2008), o que facilita estudos de expressão gênica devido ao amplo acesso às suas sequências de aminoácidos.

O metabolismo energético de insetos ocorre, principalmente, em torno do metabolismo de lipídios. Os triacilgliceróis, lipídios mais importantes para o balanço energético, são hidrolisados no intestino médio e seus produtos são absorvidos através do epitélio intestinal (BEENAKKERS et al., 1985). A hidrólise dos triacilgliceróis provenientes da dieta por ação da Triacilglicerol-lipase geram ácidos graxos que serão absorvidos através do epitélio do intestino médio. Sabe-se que essa absorção é bastante eficiente, mas não é bem compreendida quanto ao transporte através dos enterócitos (TSUCHIDA & WELLS, 1988). A família de proteínas transportadoras de ácidos graxos (FATP) e ligadoras de acil-CoA (ACBP) apresentam domínios bem conservados em sua sequência de aminoácidos ao longo das espécies: um domínio de ligação ATP/AMP e um FATP/VLACS, envolvido na ligação de ácidos graxos (DIRUSSO et al., 2008). Devido à importância dos lipídeos para o metabolismo de insetos, o estudo da ação destas proteínas na mobilização de ácidos graxos e no desenvolvimento do inseto em aspectos moleculares é de suma importância.

Metodologia:

Insetos

Os insetos *Tribolium castaneum* utilizados neste trabalho foram obtidos de uma colônia mantida no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos da Universidade Federal de Alagoas. Os insetos fazem parte de uma colônia mantida à 30°C com umidade relativa entre 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h.

Tratamento com o fármaco Orlistat®

O fármaco Orlistat® (0,1 mg/mg de farinha) foi incorporado em discos de farinha de trigo, conforme

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

Reação de amplificação quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real dos genes da FATP e ACBP foi avaliada com amostras de RNA total extraídos das larvas controle e tratadas através do Kit Maxwell® 16 LEV simplyRNA tissue (Promega, Madison, EUA). As reações de PCR foram realizadas utilizando o Kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, EUA). O protocolo foi otimizado nas seguintes condições: 20µg de RNA, 0,2µM de cada primer e 33nM de CXR-Dye em cada reação.

Resultados e Discussão:

Avaliação dos efeitos da incorporação de inibidor de lipase (Orlistate®) nos índices nutricionais, sobrevivência e expressão de FATPs nos insetos

Observamos aumento da ingestão de alimento (RCR) pelas larvas que tinham Orlistate em sua alimentação. Uma taxa maior de consumo de alimento no grupo tratado com Orlistate pode estar relacionado à uma maior ingestão de alimento a fim de compensar a redução da absorção de lipídeos da dieta causada pelo fármaco. A eficiência de conversão de alimento (ECI) também foi avaliada e os resultados demonstram uma redução da eficiência no grupo tratado com Orlistate (19,58%), efeito possivelmente relacionado à inibição da absorção de lipídeos da dieta por bloqueio da ação das lipases intestinais por ação do fármaco (Tabela 1).

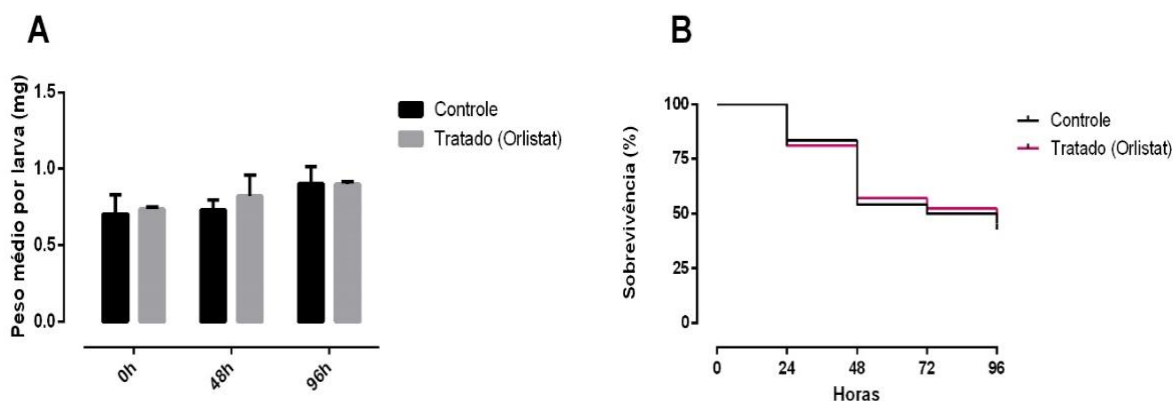
Tabela 1 - Análise dos Índices nutricionais da larva do *Tribolium castaneum* em tratamento com Orlistate após 96h. RGR = Taxa de crescimento relativo, RCR = taxa de consumo relativo, ECI = eficiência da conversão de alimento ingerido. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t e a representação com letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, $p < 0,0001$.

CONTROLE			TRATAMENTO (Orlistate 0,1mg/mg de farinha)		
RGR	RCR	ECI (%)	RGR	RCR	ECI (%)
0,0068 ^a	0,147a	46,5%	0,0554b	0,283b	19,58%

Fonte: Autor, 2017.

Os dados de mortalidade e do peso mostram que não houveram diferenças significativas nas taxas de sobrevivência e peso médio entre os grupos controle e tratado (Figura 1A e B).

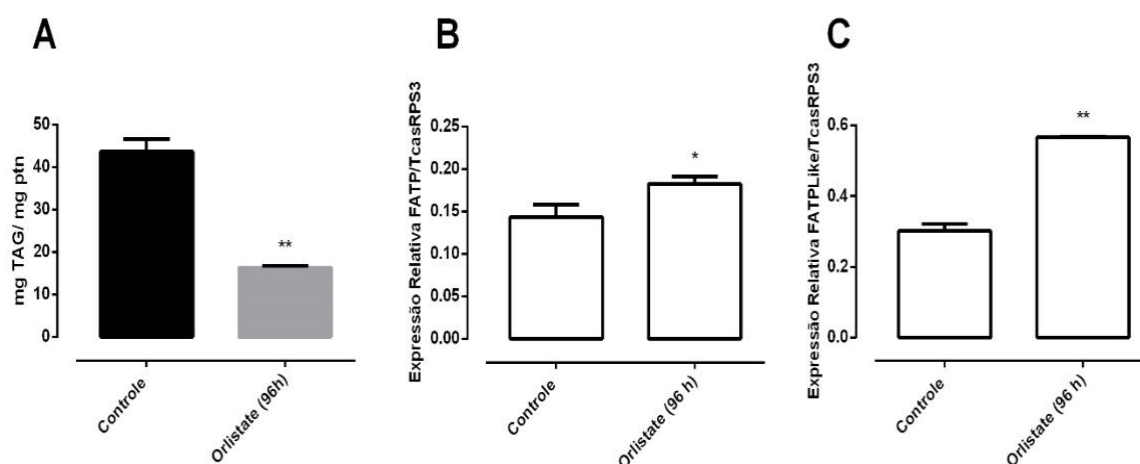
Figura 1 – Peso médio de larvas tratadas com Orlistate (0,1mg/mg de farinha) frente ao grupo controle (A) e Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier (B). As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA duas vias.



Fonte: Autor, 2017.

No entanto, correlacionando esses dados com o mecanismo de ação do Orlistate observamos uma diminuição dos níveis de triglicerídeos e aumento na expressão dos genes TcasFATP e TCASFATP-like nas larvas após 96hs de tratamento (Figura 2A, B e C).

Figura 2 – Quantificação de Triacilglicerol (TAG) (A) e Expressão relativa de TcasFATP (B) e TcasFATPLike (C) em larvas de grupo tratado com Orlistate por 96h e em larvas do grupo controle. As barras representam média \pm erro padrão de 3 determinações independentes. *: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,05$; **: Significativamente diferentes por teste t, $p < 0,0001$.



Fonte: Autor, 2017.

Conclusões:

Diante dos fatos, o uso de um medicamento para tratamento de obesidade, um inibidor de lipase pancreática possibilitou observar as flutuações nos níveis de triglicerídeos e na expressão dos genes TcasFATP e TcasFATPLike envolvidos com transporte de ácidos graxos e síntese de lipídeos em larvas do inseto *T. castaneum* sugerindo que essas proteínas podem ter a expressão regulada por medicamentos.

As perspectivas futuras do trabalho incluem uma melhor análise dos efeitos do inibidor metabólico na expressão das proteínas, assim como uma complementação de experimentos envolvendo a dieta rica em lipídeos

e seus efeitos no inseto.

Referências bibliográficas

BEDNARSKA, A. J.; STEPIEN, K. Concentration dependent toxicokinetics of copper in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ecotoxicology*. 2015.

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

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

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

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

TSUCHIDA, K.; WELLS, M. A. Isolation and characterization of a lipoprotein receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**. v.265, p. 5761–5767, 1990.