

“Pesquisa e ensino de fisiologia usando o inseto *T. molitor* (Linnaeus, 1758): instrumentação e modelo experimental de restrição alimentar”

Palavras-Chave: invertebrados; modelos experimentais alternativos; fisiologia muscular.

Autores:

Vinícius dos Santos Ribeiro, FEEC – UNICAMP

Prof. Dr. José Wilson Magalhães Bassani, FEEC - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O princípio dos 3 Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*), estabelecido por William Russel e Rex Burch em 1959, é o compromisso ético da comunidade científica de “substituir, reduzir e refinar” o uso de animais em pesquisa, ensino e outras áreas (Clark, 2018). Uma alternativa à utilização de mamíferos é o uso de invertebrados. A substituição dos mamíferos é possível e interessante por causa da genética sofisticada e da anatomia relativamente simples dos invertebrados, além da homologia genética entre eles e os mamíferos em alguns casos. Há estudos, por exemplo, que utilizam modelos de invertebrados para obter informações sobre os mecanismos de ação de drogas, como: o álcool, a cocaína e a nicotina (Wolf; Heberlein, 2003).

No Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da Unicamp, ao longo das últimas décadas, preparações com insetos vêm sendo desenvolvidas e aplicadas à pesquisa e ao ensino de fisiologia (Bassani *et al.*, 2010; Inamuzi *et al.*, 2022). Em projeto anterior, de Raposo e Bassani (2017), um transdutor de pressão foi utilizado para a construção de um mecanismo capaz de medir a força da pata de um inseto, uma vez que, na pesquisa e no ensino de fisiologia muscular, o registro e a quantificação da contração desenvolvida por um músculo ou grupos musculares são essenciais para o estudo de fenômenos básicos da transmissão neuromuscular e da função do músculo (Prince *et al.*, 2020).

No presente projeto, foi proposto, então, um sistema de instrumentação para o estudo da fisiologia muscular no inseto *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758. Trata-se de outra versão do transdutor de força mencionado. Uma versão mais robusta, sem os problemas da versão anterior e, acoplado ao conjunto, um estimulador elétrico de baixa potência. Em outras palavras, o objetivo foi montar um aparato experimental completo (um *kit*) capaz de medir a força exercida pelo músculo tibial das patas do animal durante a atividade contrátil induzida por neuroestimulação e, com isso, permitir a observação e o estudo de fenômenos fisiológicos em laboratórios de pesquisa e salas de aula.

Por este motivo, parte do projeto foi o uso do dispositivo para o registro de fenômenos fisiológicos típicos e a aplicação dele no estudo da influência da restrição calórica e proteica na força de contração do músculo tibial do *T. molitor*. A hipótese de trabalho foi que a restrição proteica e calórica afetaria o desempenho contrátil do inseto, visto que a composição da dieta afeta a mobilidade e a fisiologia cardiovascular na *Drosophila melanogaster* (Bazzel *et al.*, 2013), assim como a quantidade de proteína na composição corporal do próprio *T. molitor* (Riaz *et al.*, 2023).

METODOLOGIA:

O dispositivo é equipado com o sensor de pressão MPX2300DT1 (*Freescale Semiconductor, Austin, Texas, USA*), modificado e calibrado para funcionar como um transdutor de força, além de um circuito responsável pelo condicionamento do sinal (amplificação e filtragem), de um estimulador elétrico de baixa potência e de um sistema de aquisição de dados. As características de cada uma dessas partes seguem descritas nos itens a seguir.

Aparato Mecânico:

O suporte para o sensor de pressão, que será mostrado nos Resultados, foi montado com uma base de acrílico, sobre a qual foram colocados uma base de silicone, os eletrodos estimulatórios e uma haste de metal. Nessa haste, foram fixados um regulador de altura e um suporte de acrílico que acopla o sensor a uma alavanca. Na extremidade dessa, há um gancho ao qual é atado um fio de algodão preso à pata do inseto. Deste modo, quando a pata se contrai, a linha traciona a alavanca, que pressiona o sensor, gerando o sinal. A alavanca foi produzida através de uma impressora 3D.

Condicionamento do Sinal:

O circuito de condicionamento do sinal (amplificação e filtragem) do transdutor de força foi elaborado com amplificadores operacionais e filtros passivos passa-baixa. O principal componente usado foi o amplificador de instrumentação INA101HP (*Texas Instruments, Dallas, Texas, USA*), cuja função é amplificar o sinal do transdutor da ordem de milivolts para alguns volts. Os demais amplificadores operacionais LM741 (*Texas Instruments, Dallas, Texas, USA*) foram usados para o ajuste do *offset* do sinal e para a conclusão do processo de amplificação (dividido em duas etapas). Os filtros atuam na eliminação dos ruídos com frequência acima de 30 Hz.

Estimulador Elétrico:

O circuito responsável pela neuroestimulação do inseto foi elaborado com o circuito integrado NE555 (*Texas Instruments, Dallas, Texas, USA*). A função dele é gerar pulsos retangulares bifásicos de tensão. A amplitude (0 - 10 V), a frequência (0 - 45 Hz) e a largura dos semiciclos negativo e positivo dos pulsos (0 – 10 ms) podem ser ajustadas de acordo com o uso. Além disso, o disparo do estímulo pode ser automático, controlado por frequência, ou manual, controlado por um botão. A escolha pode ser feita por meio de uma chave seletora a depender da aplicação.

Preparação Biológica:

A experimentação com invertebrados não se enquadra na lei Arouca (n. 11.794, de 8 de outubro de 2008) e, portanto, não há a necessidade de análise por uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Independentemente disso, o procedimento seguiu normas internacionais para evitar o uso inapropriado dos animais. Durante os experimentos, insetos adultos (*T. molitor*), mantidos em caixas aeradas à temperatura de 25 ± 1 °C, eram anestesiados por resfriamento com gelo para a remoção da cabeça e de cinco das seis patas. A pata dianteira restante era amarrada com um fio de algodão ao gancho preso à extremidade da ponta da alavanca do transdutor. Um dos eletrodos era inserido entre o proto e o mesotórax, enquanto o outro era inserido no abdômen para a estimulação dos gânglios nervosos de onde partem as terminações que inervam a musculatura das patas. Assim, registrava-se a força da pata do inseto sob neuroestimulação.

Registro e Análise dos Dados:

A aquisição dos dados é realizada pelo conversor digital-analógico NI USB-6008 (*National Instruments, Austin, Texas, USA*). O processamento digital e o registro deles é feito pelo software DAQExpress (*National Instruments, Austin, Texas, USA*), disponibilizado gratuitamente no site da empresa. No caso dos experimentos realizados neste projeto, os dados foram analisados através do software GraphPad Prism (*GraphPad, San Diego, California, USA*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na Figura 1, observa-se o protótipo, em uso, do sistema de instrumentação desenvolvido para o estudo da fisiologia muscular. Os circuitos do amplificador e do estimulador elétrico, assim como o conversor analógico-digital, estão encapsulados pela base de madeira, pintada de azul, embaixo da base de acrílico do suporte do sensor de pressão. Nas laterais da caixa de madeira, que pode ser mais bem visualizada na Figura 1A, distribuem-se as chaves seletoras e os potenciômetros de precisão com os quais o usuário pode ajustar os parâmetros do pulso do estímulo elétrico, além de alterar o *offset* do sinal do transdutor e o ganho do amplificador.

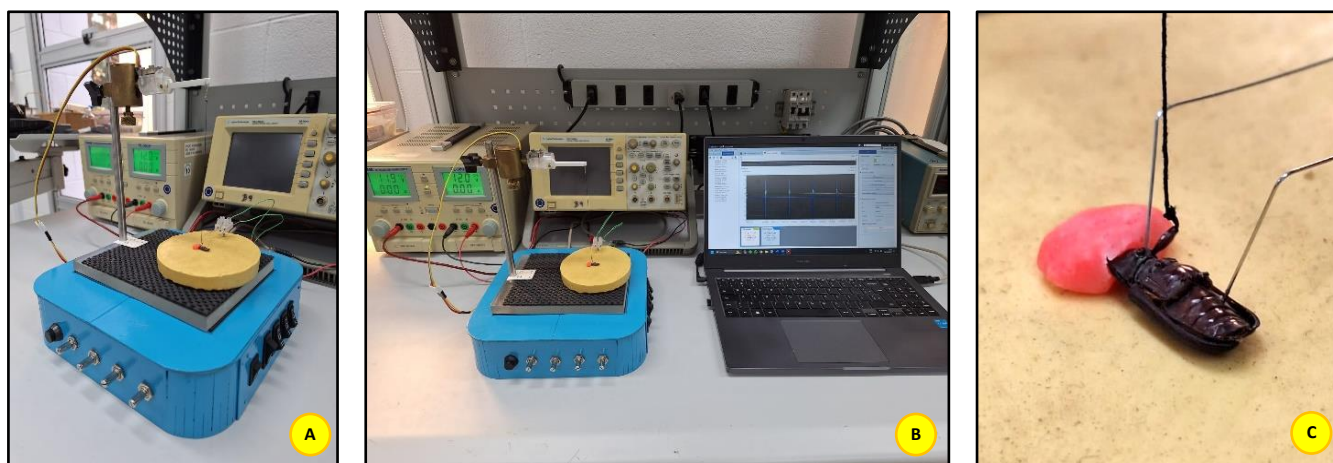


Figura 1: Protótipo, em uso, do sistema de instrumentação para o estudo da fisiologia muscular. Na Figura 1A, sobre a base de madeira em azul, observa-se o aparato mecânico descrito no Metodologia. Na Figura 1B, nota-se que a visualização dos dados depende da conexão do dispositivo com um computador com o software DAQExpress previamente instalado. Na Figura 1C, apresenta-se a preparação biológica.

Na Figura 2, encontram-se alguns dos fenômenos fisiológicos típicos que podem ser explorados com o dispositivo projetado. O registro da Figura 2A corresponde ao abalo contrátil da pata do *T. molitor*, isto é, uma contração isolada (induzida por um pulso único de tensão) seguida de relaxamento. O registro da Figura 2B é o fenômeno conhecido como somação de contrações. Ele ocorre quando um segundo abalo é induzido antes do relaxamento do primeiro, resultando na superposição das respostas mecânicas do músculo da pata e, conseqüentemente, em uma força maior. O último registro, da Figura 2C, é o estado denominado tétano. Ele ocorre a partir da somação de contrações, quando a frequência do estímulo elétrico é suficientemente alta (neste projeto, 30 Hz) para produzir contrações musculares sustentadas e uniformes (Nishida, 2013).

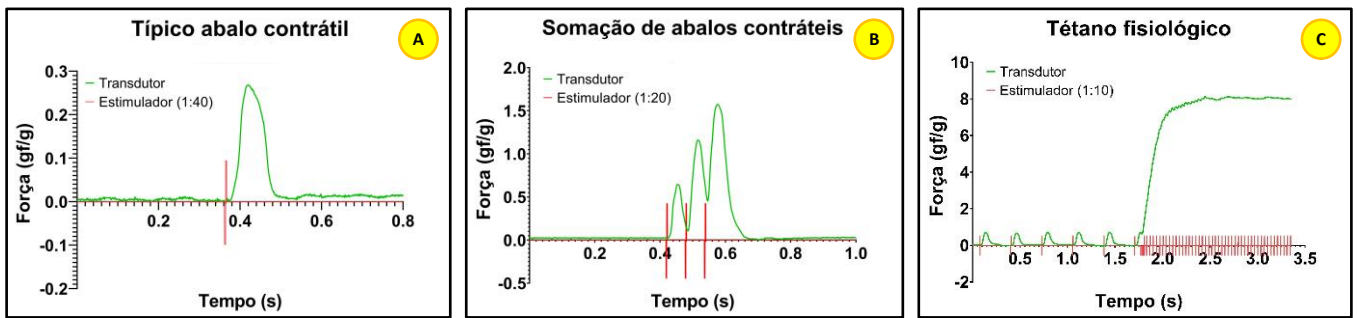


Figura 2: Fenômenos fisiológicos típicos registrados com o dispositivo. Em verde, observa-se o sinal do transdutor de força, previamente calibrado com um conjunto de pesos padrão, e, em vermelho, o sinal do estimulador elétrico, dado em volts a partir da escala com relação ao eixo vertical entre parênteses. Todos os dados foram normalizados com a massa dos insetos.

Na Figura 3, alguns parâmetros do abalo contrátil e do tétano muscular foram comparados entre indivíduos de um grupo controle (CTR), cuja alimentação foi dada por farelo de diferentes tipos (especialmente farelo de trigo) e cenoura, durante os 15 dias anteriores à realização do experimento, e indivíduos de um grupo tratado (RCP), cuja alimentação foi dada apenas por cenoura. O intuito foi induzir a restrição calórica e proteica dos insetos ao remover o farelo da alimentação dos insetos, posto que, por exemplo, a composição do farelo (de trigo) é dividida em 65% de carboidratos e 16% de proteínas, enquanto, no caso da cenoura, são 8% de carboidratos e 1% de proteínas (Vitac, 2024). A cenoura é necessária em ambas as dietas para o fornecimento de água aos insetos.

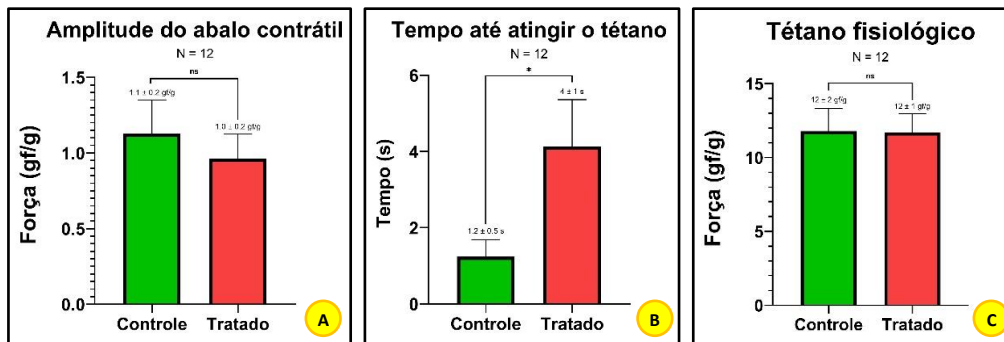


Figura 3: Comparação de alguns dos parâmetros entre os grupos controle e tratado. Foram utilizados 12 pares de indivíduos (controle e tratado). Os gráficos mostram a média e o desvio padrão de cada parâmetro para ambos os grupos. Foi utilizado o teste t não pareado para a análise estatística. Nas Figuras 3A e 3C, os dados foram normalizados com as massas dos insetos. Na Figura 3B, o parâmetro em questão se refere ao tempo do início da estimulação em alta frequência até o valor de regime do tétano fisiológico.

A média dos parâmetros dos abalos contráteis dos grupos CTR e RCP não apresentaram, entre si, diferenças significativas. No caso da Figura 3A, por exemplo, na comparação da amplitude ou força máxima do abalo contrátil, o valor-p foi de 0.5569. Sob estimulação de alta frequência, não foi registrada diferença significativa para o valor de regime do tétano fisiológico ($p = 0.9681$); contudo, uma diferença significativa ($p = 0.0389$) foi observada para o tempo desde o início da estimulação até a preparação atingir a força máxima (tétano fisiológico). Ou seja, os animais do grupo RCP atingiram a mesma força que os animais do grupo CTR, mas demandaram mais tempo para isso.

Não há, por enquanto, condições de explicar o motivo dos animais do grupo RCP precisarem de mais tempo para atingir o valor máximo. São diversos os processos fisiológicos que determinam o período de ascensão da força muscular durante o tétano. Desde a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático até o acoplamento dos filamentos grossos aos filamentos finos durante o ciclo das pontes cruzadas, cada etapa demanda um tempo. Sob certas condições, por exemplo, estima-se que

são necessários 20 ms para o músculo de sapo atingir 50% do valor de regime do tétano fisiológico por causa da cinética do acoplamento das pontes cruzadas (Edman; Josephson, 2007). Portanto, é necessário que testes sejam adicionados aos experimentos para guiar a elaboração de uma explicação sobre os resultados das Figuras 3B e 3C.

CONCLUSÕES:

O sistema de instrumentação desenvolvido mostrou que a fisiologia muscular do *T. molitor* condiz, ao menos em parte, com o esperado, isto é, os músculos esqueléticos da pata do *T. molitor* são músculos síncronos, pois a taxa de contração é 1:1 com relação aos impulsos nervosos (Nation, 2008). Com isso, o dispositivo é capaz de, por meio de estimulação neuromuscular ou muscular direta, reproduzir outros fenômenos observados em músculos de vertebrados, como a somação de contrações e o tétano muscular, tal que ele possa ser aplicado ao ensino de fisiologia básica. Ademais, apesar da simplicidade da preparação biológica, ele pode ser utilizado como um instrumento para a realização de pesquisa com modelos experimentais alternativos.

AGRADECIMENTOS:

Ao CNPq pelo apoio financeiro e fomento à pesquisa (bolsa PIBIC-VSR, processo 122470/2023-0; bolsa Pq-1A-JWMB-CNPq, processo 304087/2022-0; bolsa Finep, n. 01.13.0214.00); ao Laboratório Nacional para Estudo do Cálcio Celular (LabNECC – CEB – Unicamp) pela infraestrutura; e à equipe da Área de Pesquisa e Desenvolvimento do CEB pelo apoio técnico.

BIBLIOGRAFIA:

- BASSANI, J. W. M. *et al.* Teaching heart physiology to bioengineers using the insect heart. *In: XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica*, 2010, Tiradentes - MG, Brasil. **Anais**, n. 251, p. 709-712, 2010.
- BAZZEL, B. *et al.* Dietary composition regulates *Drosophila* mobility and cardiac physiology. **J Exp Biol**, v. 216, n. 5, p. 859-868, 2013. DOI 10.1242/jeb.078758.
- CLARK, J. M. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **Br J Nutr**, v. 120, n. S1, p. S1-S7, 2018. DOI 10.1017/s0007114517002227.
- EDMAN, K. A.; JOSEPHSON, R. K. Determinants of force rise time during isometric contraction of frog muscle fibres. **J Physiol**, v. 580, n. 3, p. 1007-1019, 2007. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.119982.
- INAZUMI, F. H. K *et al.* **Estudo quantitativo da influência da frequência estimulatória sobre parâmetros hemodinâmicos no coração do inseto *Tenebrio molitor* (Linnaeus,1758)**. *In: XXX Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP*, 2022, Campinas – SP, Brasil.
- NATION, J. L. **Insect physiology and biochemistry**. 2nd ed. New York: CRC Press, 2008. 544 p.
- NISHIDA, S. M. Fisiologia muscular. *In: Curso de Fisiologia da UNESP*, 2013, Botucatu – SP, Brasil. **Material de Aula**, p. 120-130, 2013.
- PRINCE, N. *et al.* Rat skeletal muscle-nerve preparation to teach skeletal muscle physiology. **Adv Physiol Educ**, v. 45, n. 4, p. 869-879, 2021. DOI: 10.1152/advan.00143.2020.
- RAPOSO, G. R. **Modelo experimental e instrumentação para estudos fisiológicos do músculo esquelético do inseto *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758)**. Exame de Qualificação (Mestrado em Engenharia Elétrica) — Faculdade de Engenharia Elétrica e da Computação (FEEC), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2017.
- RIAZ, K. *et al.* Growth optimization and rearing of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as a sustainable food source. **Foods**, v. 12, n. 9, 2023. DOI 10.3390/foods12091891.
- VITAT. **Busca de Alimentos**. São Paulo, SP: RD Saúde, c2024. Disponível em: <https://vitat.com.br/alimentacao/busca-de-alimentos/>. Acesso em: 2 ago. 2024.
- WOLF, F. W.; HEBERLEIN, U. Invertebrate models of drug abuse. **J Neurobiol**, v. 54, n. 1, p. 161-178, 2003. DOI 10.1002/neu.10166.