

“Modelo experimental de suplementação alimentar com coenzima Q10 no inseto *T. molitor* (Linnaeus, 1758)”

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 para com a substituição, a redução e o refinamento do uso de animais em pesquisa, ensino e outras áreas (Clark, 2018). Neste contexto, o uso de invertebrados com genética sofisticada se apresenta como uma alternativa à utilização de mamíferos. Tal substituição é possível por causa da homologia genética entre os grupos, além de vantajosa devido à anatomia relativamente simples, à facilidade de manejo e ao baixo custo de manutenção dos invertebrados (Adamski *et al.*, 2019). 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 dos últimos anos, preparações com insetos vêm sendo desenvolvidas e aplicadas à pesquisa e ao ensino de fisiologia (Bassani *et al.*, 2010; Inamuzi *et al.*, 2022). À vista da importância do registro e da quantificação da contração desenvolvida por um ou mais músculos para o estudo de fenômenos básicos da transmissão neuromuscular (Prince *et al.*, 2021), desenvolveu-se, em projetos anteriores (Machado; Bassani, 2012; Raposo; Bassani, 2017), a técnica para a medição da força contrátil da pata do *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758). No ano passado (Ribeiro; Bassani, 2024), a técnica foi aperfeiçoada e a instrumentação necessária para a aplicação dela à pesquisa e ao ensino foi construída.

A coenzima Q10 é um componente lipídico da cadeia de transporte de elétrons requerido para a produção do ATP mitocondrial no processo de fosforilação oxidativa (Grant *et al.*, 2010). Trata-se, aparentemente, do único lipídeo sintetizado endogenamente que tem função antioxidante e que é amplamente distribuído nos tecidos (Jankowski *et al.*, 2016). Recentemente, essa coenzima vem sendo utilizada como suplemento para melhorar o desempenho físico (Chen *et al.*, 2019). A hipótese foi de que a suplementação com CoQ10 melhoraria o desempenho contrátil do músculo tibial do *T. molitor*, em particular quando o desempenho máximo é requerido (tétano fisiológico).

Os objetivos deste projeto foram: desenvolver uma versão menor, mais barata e de fácil reprodução do sistema de medição da força contrátil da pata do *T. molitor*; e estudar a influência da suplementação alimentar com CoQ10 na contração do músculo tibial do *T. molitor*.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Nesta seção, estão descritos os materiais e os procedimentos adotados para a minimização do tamanho, redução do custo e facilitação da reprodução do dispositivo de medição da força contrátil do *T. molitor*, além dos métodos usados na experimentação e na análise dos dados.

Placa de Circuito Impresso:

O método de montagem dos circuitos de amplificação e estimulação foi melhorado. Na versão anterior, havia duas placas de circuito impresso, uma para o circuito de amplificação do sinal do sensor (4 x 10,5 cm) e outra para o circuito de estimulação elétrica (4 x 13 cm). Ambas foram montadas com componentes PTH (*Through-Hole*), ocupando um espaço relativamente grande. Agora, há uma única placa de circuito impresso para ambos os circuitos (7,5 x 7,5 cm). Além disso, ela foi fabricada pela PCBWay (*Hangzhou, Zhejiang, China*) com padrão industrial e montada, no laboratório, com componentes SMD (*Surface Mount Device*), apresentando maior resistência à corrosão e ocupando menos espaço. O espaço liberado permitiu a instalação do conversor simétrico AC/DC RAC10-12DK/277 (*Recom Power, Gmunden, Gmunden, Austria*) dentro do dispositivo, removendo a necessidade de uma fonte de alimentação externa, simétrica e de 12 V.

Sistema de Aquisição de Dados:

A versão anterior foi equipada com o módulo USB-6008 (*National Instruments, Austin, Texas, USA*), um sistema de aquisição de dados de alto custo (~R\$ 500,00). Pelo excesso de funcionalidades não utilizadas, ele ocupou espaço e elevou o custo do dispositivo além do necessário. Além disso, a interação com o módulo exigia o uso do software DAQExpress (*National Instruments, Austin, Texas, USA*), que, embora gratuito, não é atualizado desde 2020 e foi desenvolvido para o Windows 10 (*Microsoft, Redmond, Washington, USA*), cujo suporte será encerrado em outubro de 2025. Ou seja, problemas de compatibilidade poderiam impedir o uso do dispositivo no futuro.

A nova versão foi equipada com o Arduino Nano (*Arduino, Monza, Lombardy, Italy*), uma placa de prototipagem eletrônica de baixo custo (~R\$ 30,00) composta por um microcontrolador ATmega328P, uma conexão USB-B mini e um conversor analógico-digital de dez bits. Foi necessário projetar um circuito para condicionar os sinais de saída dos circuitos de amplificação e estimulação (-12 até +12 V) para a faixa de operação do conversor (0 até 5 V). A linguagem C foi utilizada para a programação do microcontrolador e a linguagem Python foi utilizada para a criação da interface gráfica no computador. O novo dispositivo, portanto, além de mais barato, é baseado em hardware e software livres.

Encapsulamento:

O suporte do sensor, o encapsulamento do circuito e o regulador de altura foram reformulados. Na versão anterior, o suporte do sensor era uma peça de acrílico de difícil reprodução. Agora, com o desenho tridimensional, ele pode ser feito em qualquer impressora 3D, seja em resina (material utilizado) ou outro material. Isso também vale para o encapsulamento, que, além de maior (23 x 23 x 6 cm), era feito de MDF. A partir de agora, ele é feito de filamento termoplástico e é menor (18 x 18 x 5 cm). O novo dispositivo, portanto, é mais compacto e robusto. Ademais, o novo regulador de altura permite um ajuste mais fino e de maior amplitude, além de possuir uma lateral milimetrada que possibilita um controle quantitativo da posição do sensor e, logo, da extensão da pata do inseto.

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 adotado segue normas internacionais para evitar o uso inapropriado dos animais, respeitando as regras de qualidade e ética quanto à quantidade, às condições de manutenção, às técnicas de manipulação, a eutanásia e o descarte.

Os 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 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 (na flexão da pata) do inseto sob neuroestimulação.

Análise dos Dados:

A análise dos dados foi feita por meio do software GraphPad Prism (*GraphPad, San Diego, California, USA*). Utilizou-se o teste t não pareado para comparação entre médias e a significância estatística foi assumida para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na Figura 1, observam-se ambos os dispositivos de medição da força contrátil da pata do *T. molitor*, o antigo e o novo. A nova versão é menor, mais barata e mecanicamente mais robusta que a versão anterior. Na Figura 2, observam-se as interfaces gráficas de visualização dos dados em tempo real, a antiga, distribuída pela *National Instruments*, e a nova, de código aberto. A nova, apesar de não possuir todas as funcionalidades da antiga, oferece o necessário (isto é, a visualização e o registro – em arquivo de texto – dos dados em tempo real) e pode ser aprimorada por qualquer usuário.

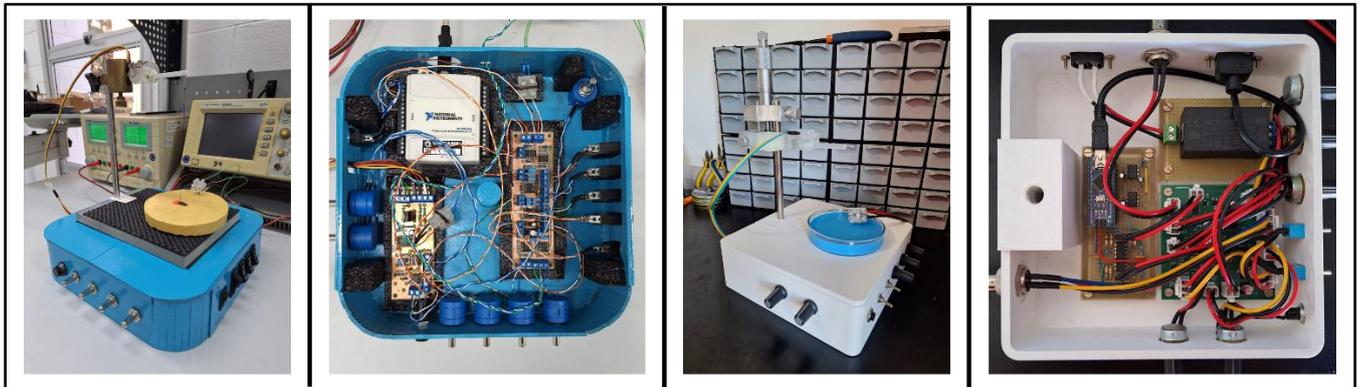


Figura 1 - Dispositivos de medição da força contrátil da pata do *T. molitor*. À esquerda, as vistas externa e interna do dispositivo antigo (23 x 23 x 6 cm), com encapsulamento de MDF em azul; e, à direita, as vistas externa e interna do novo dispositivo (18 x 18 x 5 cm), com encapsulamento de filamento termoplástico em branco.

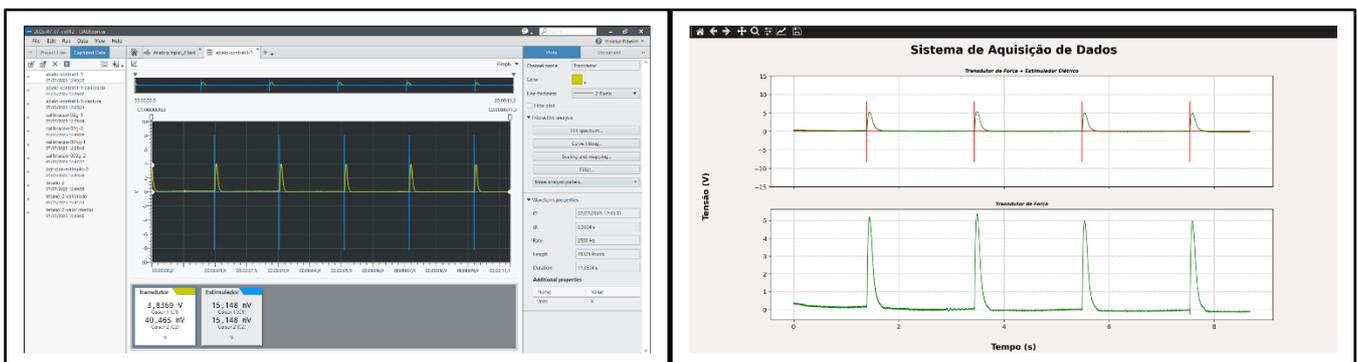


Figura 2 – Interfaces gráficas de visualização e registro dos dados (sinal amplificado do sensor e estímulo elétrico) em tempo real. À esquerda, um registro de tela da interface antiga, distribuída pela *National Instruments*; e, à direita, um registro de tela da interface nova, de código aberto (Python).

Nas Figuras 3 e 4, apresenta-se a comparação dos parâmetros do abalo contrátil e do tétano fisiológico entre os grupos controle e tratado. Na Figura 3, a comparação é estabelecida entre os grupos cujo tratamento foi realizado apenas durante a fase adulta, por um período de 21 dias. Na Figura 4, a comparação é estabelecida entre os grupos cujo tratamento foi realizado durante a fase larval, pelo período de, aproximadamente, 21 dias, e durante a fase adulta, por um período adicional de 7 dias. Em ambos, a alimentação do grupo controle foi constituída por farelo e cenoura, enquanto a alimentação do grupo tratado foi constituída por farelo, cenoura e CoQ10 em pó.

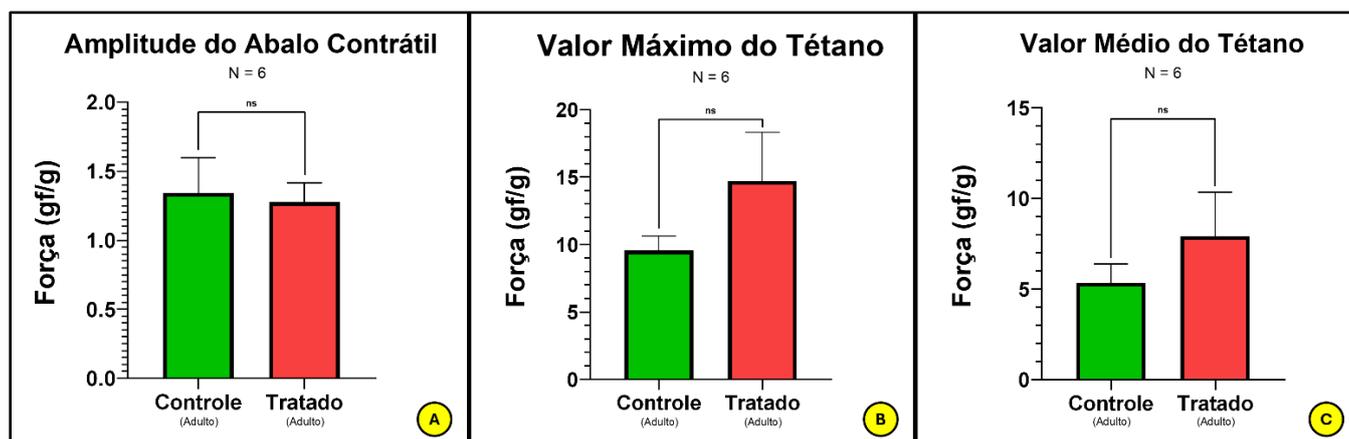


Figura 3 - Comparação dos parâmetros entre os grupos controle e tratado mantidos apenas na fase adulta. Foram utilizados 6 pares de indivíduos (controle e tratado). Os gráficos mostram a média e o desvio padrão. Os dados foram normalizados com as massas dos insetos.

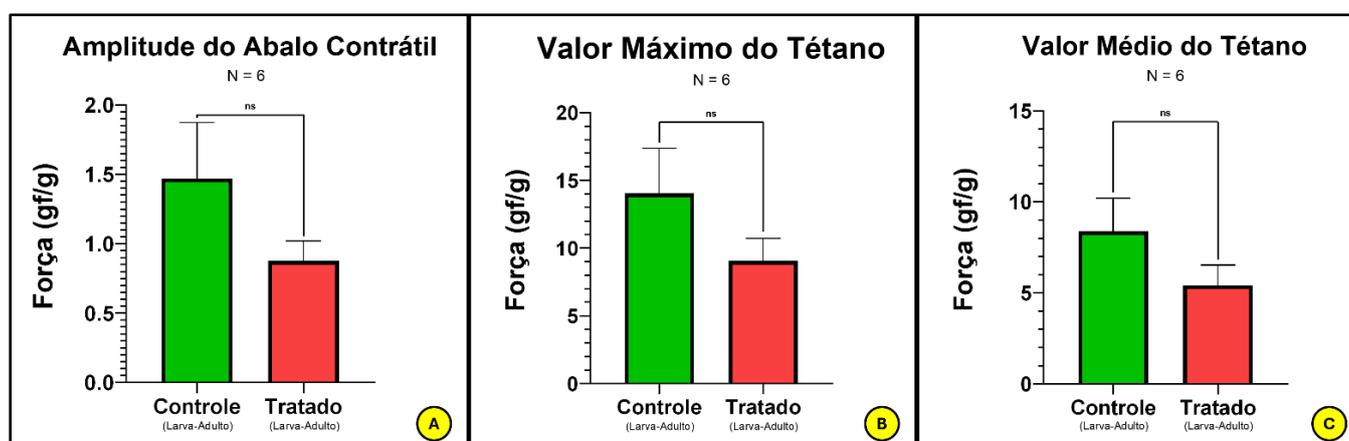


Figura 4 – Comparação de alguns dos parâmetros entre os grupos controle e tratado mantidos desde a fase larval. Foram utilizados 6 pares de indivíduos (controle e tratado). Os gráficos mostram a média e o desvio padrão. Os dados foram normalizados com as massas dos insetos.

Nenhuma das comparações apresentou diferença estatisticamente significativa, incluindo as comparações dos parâmetros temporais, como a duração do abalo, o tempo de meio relaxamento e o tempo de subida do tétano, que não estão nas Figuras 3 e 4. Na comparação da amplitude do abalo contrátil, os valores-p foram de, respectivamente, 0,8221 e 0,1945 (Figuras 3A e 4A). Sob estimulação de alta frequência, na comparação do valor máximo do tétano fisiológico, os valores-p foram de, respectivamente, 0,1991 e 0,2074 (Figuras 3B e 4B); e, na comparação do valor de regime do tétano fisiológico, os valores-p foram de, respectivamente, 0,3527 e 0,1944 (Figuras 3C e 4C). A ausência de significância estatística é, muito provavelmente, resultado da variabilidade das amostras, dado o baixo número de experimentos por grupo (N = 6).

Sendo assim, não é possível afirmar que a suplementação com CoQ10 alterou o desempenho contrátil do músculo tibial do *T. molitor*. Apenas se pode dizer que existe uma tendência à melhora da resposta muscular quando o tratamento foi realizado apenas na fase adulta, e à piora quando o tratamento foi realizado desde a fase larval. A primeira pode ser consequência da aceleração do transporte de elétrons e do aumento da produção de ATP, que podem ter causado um efeito antifadiga (Chen *et al.*, 2019). A segunda, por outro lado, pode ser consequência da degradação da CoQ10 pelo excesso na dieta. Tal hipótese foi levantada na literatura para explicar a ineficiência de doses elevadas na suplementação da *D. melanogaster* com CoQ9 (Cirilli *et al.*, 2020). Na mesma pesquisa, foi observado que a concentração da coenzima no organismo das moscas aumenta significativamente no início da vida adulta. Se a concentração endógena da CoQ10 também for maior na fase adulta do que na fase larval para o *T. molitor*, o mecanismo de degradação pode ter sido ativado apenas para o grupo tratado desde a fase larval, justificando a diferença de desempenho. De qualquer forma, deve-se aumentar o número de experimentos (N) para comprovar, ou não, as tendências observadas.

CONCLUSÕES:

A nova versão do dispositivo apresenta o melhor encapsulamento para o sistema de medição da força contrátil do *T. molitor*. Ele é compacto, barato e reprodutível. Além disso, a suplementação com CoQ10, quando realizada apenas na fase adulta, parece melhorar o desempenho muscular do inseto. Quando realizada desde a fase larval, por outro lado, a suplementação parece afetar o desempenho. Tais tendências ainda precisam de confirmação estatística. Logo, em futuras pesquisas, deve-se aumentar o número de experimentos (N). Também se sugere: o uso de diferentes dosagens e a separação dos grupos por sexo, dada a não desprezível diferença de absorção entre machos e fêmeas observada para a *D. melanogaster* (Cirilli *et al.*, 2020).

AGRADECIMENTOS:

Ao CNPq (PIBIC-VSR, processo 123447/2024-0; Pq-1A-CNPq-JWMB, processo 304087/2022-0); à Finep (n. 01.13.0214.00); ao Laboratório Nacional para Estudo do Cálcio Celular (LabNECC–CEB–Unicamp) pela infraestrutura; à equipe da Área de P&D do CEB pelo apoio técnico; e à profa. Dra. Rosana A. Bassani pelas sugestões e apoio no uso da CoQ10.

BIBLIOGRAFIA:

- ADAMSKI, Z. *et al.* Beetles as model organisms in physiological, biomedical and environmental studies – A review. **Front Physiol**, v. 10, p. 319, 2019. DOI 10.3389/fphys.2019.00319.
- ARENAS-JAL, M.; SUÑÉ-NEGRE, J. M.; GARCÍA-MONTOYA, E. Coenzyme Q10 supplementation: efficacy, safety, and formulation challenges. **Compr Rev Food Sci Food Saf**, v. 19, n. 2, p. 574-594, 2020. DOI 10.1111/1541-4337.12539.
- 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.
- 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.
- CHEN, H. C. *et al.* Ubiquinol supplementation alters exercise induced fatigue by increasing lipid utilization in mice. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2550, 2019. DOI 10.3390/nu11112550.
- CIRILLI, I. *et al.* Endogenous coenzyme Q content and exogenous bioavailability in *D. melanogaster*. **Heliyon**, v. 10, n. 18, 2024. DOI 10.1016/j.heliyon.2024.e37854.
- GRANT, J.; SALDANHA, J. W.; GOULD, A. P. A *Drosophila* model for primary coenzyme Q deficiency and dietary rescue in the developing nervous system. **Dis Model Mech**, v. 3, n. 11-12, p. 799-806, 2010. DOI 10.1242/dmm.005579.
- 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.
- JANKOWSKI, J *et al.* Coenzyme Q10 - A new player in the treatment of heart failure? **Pharmacol Rep**, v. 68, n. 5, p. 1015-1019, 2016. DOI 10.1016/j.pharep.2016.05.012.
- MACHADO, R. C.; BASSANI, R. A.; BASSANI, J. W. M. **Estimulação elétrica de gânglios torácicos *in situ* no inseto *Tenebrio molitor*: aplicação ao estudo da contração muscular**. *In*: XX Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2012, Campinas – SP, Brasil.
- 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.; BASSANI, J. W. M. **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.
- RIBEIRO, V. S.; BASSANI, J. W. M. **Pesquisa e ensino de fisiologia usando o inseto *T. molitor* (Linnaeus, 1758): instrumentação e modelo experimental de restrição alimentar**. *In*: XXXII Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP, 2024, Campinas – SP, Brasil.
- 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.