



EXPRESSÃO DE mRNA DE GLUTATIONA PEROXIDASE EM TILÁPIAS-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*) DESAFIADAS COM FUMONISINA

Gustavo Krupek¹, Bruno Meneguim Artacho², Gabriel Roldi Geraldo³, Stefania Caroline Claudino da Silva⁴, Bruno Lala⁵, Eliane Gasparino⁶

RESUMO: O objetivo do projeto foi avaliar a expressão gênica do gene que codifica a enzima glutatona peroxidase (GPX) no fígado de alevinos de tilápias-do-Nilo desafiado com níveis crescente da micotoxina fumonisina. Foram utilizados 180 peixes da linhagem Tailandesa revertidos sexualmente, distribuídos em caixas de fibrocimento com volume de 1000L cada, com sistema individual de renovação da água e aeração constante. Cada tanque foi dividido em três hapas com volume individual de 250L e 15 peixes em cada hapa. Foram elaboradas três dietas isocalóricas e isototéicas, variando apenas quanto à inclusão de diferentes concentrações de fumonisina B1 + B2 (grupo 1 – (0,0mg de fumonisina; grupo 2 – 20mg de fumonisina; grupo 3 – 40mg de fumonisina/kg de ração). Para análise da expressão gênica foram coletadas amostras de fígado dos animais com 15 e 30 dias de consumo das dietas experimentais. e realizada a extração do RNA total. Para avaliação da expressão gênica foi realizada transcrição reversa para síntese de cDNA. A abundância de DNA complementar foi verificada por meio de PCR em tempo real. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por teste de Tukey a 5% de significância. Não houve variação na expressão da GPX entre os diferentes grupos após 15 dias de experimento. Após 30 dias de consumo, houve aumento na expressão gênica de GPX dos animais que consumiram a dieta com 40 mg FB/kg de fumonisina em relação aos demais grupos.

PALAVRAS-CHAVE: Alevinos; GPX; PCR em tempo real; *Fusarium*

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se buscado investigar a qualidade sanitária de grãos destinados alimentação animal e humana, identificando possíveis problemas, como a presença de fungos, com o intuito de aumentar a produtividade, reduzir os prejuízos econômicos e melhorar a qualidade de vida da população mundial (Jobim et al., 2001). A micotoxina fumonisina é produzida durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (Turner et al., 1999), contaminando em larga escala os grãos de milho.

Estudos têm demonstrado que a intoxicação por fumonisinas pode aumentar o estresse oxidativo (Theumer et al., 2010; Bernabucci et al., 2011), sendo provável que estas alterações do estado oxidativo estejam relacionadas com mudanças nos padrões de sinalização, e conseqüentemente, de expressão dos genes relacionados ao combate de radicais livres, como as glutatonas e as proteínas de choque térmico, popularmente chamadas de HSPs.

Até o presente momento, não há relatos na literatura de estudos que demonstrem a expressão do gene que codifica a enzima glutatona peroxidase em peixes desafiados com fumonisinas. Deste modo, objetivamos com esta pesquisa avaliar a expressão gênica do gene GPX no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo desafiados com níveis crescentes de fumonisinas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos neste estudo foram realizados de acordo com as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais-Unicesumar (CEUA). O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá - UEM, onde 180 peixes revertidos sexualmente da linhagem Tailandesa, com peso inicial de aproximadamente 2,5g. Os peixes foram distribuídos em três caixas de fibrocimento com volume de 1000L cada, com sistema individual de renovação da água (25% ao dia) e aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a um soprador central. Cada tanque foi dividido em três hapas totalizando nove unidades experimentais com três tratamentos e três repetições. Foram alojados 15 peixes em cada hapa com volume

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR, Maringá – PR. gustavokrupek2008@hotmail.com

² Bolsista PIBIC/CNPq-UniCesumar.

³ Bolsista PIBIC/Fundação Araucária-UniCesumar.

⁴ Professora Dra. Unicesumar

⁵ Discente de Doutorado PPZ - UEM

⁶ Professora Dra. UEM



individual de 250L. Os peixes passaram por período de adaptação de 15 dias antes do início do experimento. A temperatura foi aferida duas vezes ao dia em cada tanque às 8:00 e 16:00 horas. As variáveis oxigênio dissolvido e p.H. foram controladas pela manhã durante todo o experimento por meio de kit colorimétrico.

Foram elaboradas três dietas isocalóricas (aproximadamente 3000 kcal de energia digestível ED kg⁻¹ de dieta) e isoprotéicas (aproximadamente 33% de proteína bruta), variando apenas quanto à inclusão de diferentes níveis de fumosina B1 + B2. Foram formados três grupos experimentais: GRUPO 1 – dieta controle com 0,0 mg de inclusão de FB kg⁻¹ de ração, GRUPO 2 - 20 mg de inclusão de FB kg⁻¹ e GRUPO 3 - 40 mg de FB kg⁻¹. A dieta peletizada, seca em estufa de ventilação forçada por 48 horas, homogeneizadas, classificada de acordo com a granulometria (1 a 2mm) e distribuída manualmente três vezes ao dia até saciedade aparente dos peixes.

Para análise de expressão gênica, amostras de fígado de seis animais de cada tratamento, previamente anestesiados em imersão com 9 mg L⁻¹ de benzocaína, foram coletadas ao primeiro e 15º dia de experimento, e armazenados em RNA Holder (BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brasil) a -20°C até a extração de RNA total. O RNA total foi extraído de amostras de fígado (35mg) usando Trizol® (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Todos os materiais utilizados para extração foram previamente tratados com o inibidor RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A concentração do RNA total foi medida em aparelho espectrofotômetro ao comprimento de onda de 260 nm. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídio (10%) e visualizado sob luz ultravioleta. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para remover possível contaminação com DNA genômico. Para a síntese de cDNA foi utilizado kit SuperScript™ III First-StrandSynthesisSuper Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o corante fluorescente SYBR Green (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA).

Os *primers* utilizados para avaliação do gene glutationa peroxidase foi desenhado com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov. Três controles endógenos relatados por Yang et al. (2013) foram testados: UBCE (enzima conjugadora de ubiquitina - XM_003460024), EF1A (fator de alongação 1α - AB075952) e ACTB (β actina - XM_003455949). Destes, apenas um foi selecionado, com base na melhor eficiência (entre 90 e 110%) e na não variação estatisticamente entre os tratamentos. Todas as reações foram realizadas para um volume final de 12,5 µL e em duplicatas. As curvas de dissociação foram analisadas para a verificação de qualquer presença de dímeros de *primers* ou produtos não específicos.

Os dados provenientes da análise de PCR em tempo real foram transformados utilizando 2^{-ΔCT}. Os dados transformados de expressão gênica, bem como os dados do perfil de ácidos graxos e desempenho foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Foram testados os efeitos de diferentes níveis de fumonisina na ração (0, 20 e 40 mg Kg⁻¹), tempo de exposição (15 e 30 dias) e interação entre os dois. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão com o nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A expressão gênica da GPX não variou aos primeiros 15 dias de experimento, indiferente das concentrações de fumonisinas da dieta. Para os animais desafiados por 30 dias, houve aumento da expressão de GPX para os animais que consumiram dietas contendo 40 mg FB kg⁻¹, quando comparado com o controle (Figura 1).

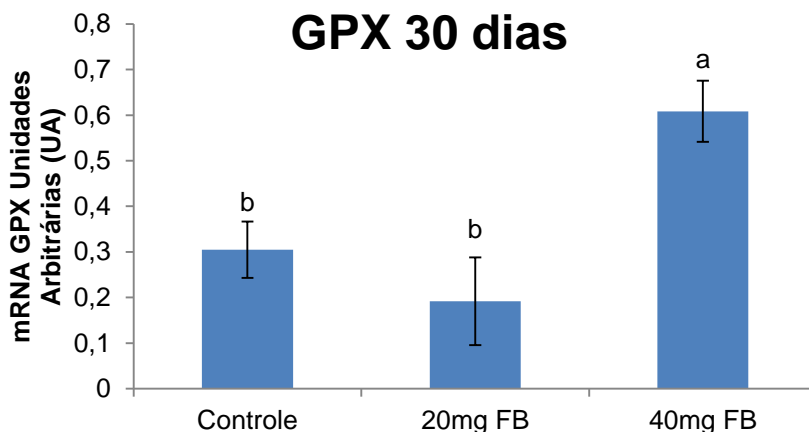


Gráfico 1: Dosagem de GPX com 30 dias

O aumento da expressão da glutationa peroxidase observados nesta pesquisa para os animais desafiados com 40mg de FB kg⁻¹ por 30 dias, sugerem aumento do estresse oxidativo. Em frangos de corte, o desafio com



100mg de FB kg⁻¹ de ração durante 21 dias aumentou o peso relativo do fígado, piorou a conversão alimentar e aumentou a relação entre os esfingolípídios intermediários esfinganina / esfingosina. Além disso, o desafio com estes níveis de fumonisina aumentaram os níveis de TBARS hepáticos e atividade da enzima antioxidante catalase (Poersch et al., 2014). Domija & Abramov (2011) observaram que o desafio com fumonisinas promoveu a indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio de diminuição na taxa de respiração celular e mitocondrial e aumentou o nível intracelular de glutatona (GSH), evidenciando o aumento do estresse oxidativo, corroborando com os resultados observados nas tilápias em nosso estudo.

4 CONCLUSÃO

O aumento da expressão do gene que codifica a enzima antioxidante glutatona peroxidase pelo desafio por fumonisinas é tempo – dose dependente.

REFERÊNCIAS

Bernabucci, U.; Colavecchia, L.; Danieli, P.P.; Basiricò, L.; Lacetera, N.; Nardone, A.; Ronchi, B. Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. **Toxicol In Vitro**. Apr;25(3):684-91, 2011.

Jobim, C.C.; Gonçalves, G.D.; Santos, G.T. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas "versus" desempenho animal e qualidade de seus produtos. P.242-261. Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas (2001 - Maringá) **Anais...** 2001.

Theumer, M.G.; Cánepa, M.C.; López, A.G.; Mary, V.S.; Dambolena, J.S.; Rubinstein, H.R. Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B(1), and oxidative stress biomarkers status. **Toxicology**. V.31;268(1-2):104-10, 2010.

Turner, P. C.; Nikiema, P.; Wild, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, Amsterdam, v.443, p.81-93, 1999.

Poersch AB, Trombetta F, Braga AC, Boeira SP, Oliveira MS, Dilkin P, Mallmann CA, Figuera MR, Royes LF, Oliveira MS, Furian AF. Involvement of oxidative stress in subacute toxicity induced by fumonisin B1 in broiler chicks. **Vet Microbiol**. 2014 Nov 7;174(1-2):180-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.08.020.

Domijan AM, Abramov AY. Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis--implication to mechanism of cell toxicity. **Int J Biochem Cell Biol**. 2011 Jun;43(6):897-904. doi: 10.1016/j.biocel.2011.03.003.