



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA SPL NO FÍGADO DE TILÁPIAS-DO-NILO DESAFIADAS COM NÍVEIS CRESCENTES DE FUMONISINAS POR 30 DIAS

Dayne Loraine Hedler¹; Stefania Caroline Claudino da Silva²

¹Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. Bolsista PROBIC-UniCesumar.
dayne.hedler@gmail.com

²Orientadora, Doutora, Discente do Departamento de Medicina Veterinária, Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR.
stefania.silva@unicesumar.edu.br

RESUMO

Nos últimos anos, têm-se buscado investigar a qualidade sanitária de grãos destinados alimentação animal e humana, identificando possíveis problemas, como a presença de fungos. A micotoxina fumonisina é produzida durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, e podem prejudicar as funções do sistema imunológico, causar edemas pulmonares, lesões no fígado e rins, levando o animal à morte, dependendo dos níveis de contaminação e tempo de exposição à toxina. A ação da fumonisina envolve a alteração da síntese de ceramida pelo bloqueio enzimático da ceramida sintase, promovendo desta forma, redução na síntese de esfingolípídios complexos e acúmulo e precursores metabólicos. Este acúmulo de intermediários pode ser controlado pela bioconversão das bases esfingóides a bases fosfatadas, e sucessivamente a fosfoetanolamina pela enzima esfingosina-esfinganina fosfato liase (SPL). Deste modo, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a expressão gênica de SPL, um gene relacionado ao estresse celular, no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com três níveis distintos de inclusão de fumonisina/kg de ração por 30 dias de consumo. A expressão gênica foi realizada utilizando aparelho de PCR em tempo real e primers específicos. Os resultados foram avaliados por análise de variância utilizando o software SAS, a 5% de probabilidade.

PALAVRAS-CHAVE: Micotoxinas; Expressão gênica; Peixes.

1 INTRODUÇÃO

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. Um estudo realizado no Brasil com amostras de ração oriundas de fazendas de tilápias-do-Nilo demonstrou contaminação por fumonisina B1 em 98% das amostras avaliadas (BARBOSA et al., 2013). Esta ampla incidência de fumonisinas na dieta de peixes representa um motivo de preocupação, uma vez que esta micotoxina pode causar prejuízos a estes animais.

A toxicidade de fumonisina tem sido apontada como causa de prejuízo para diferentes espécies de peixes. Para tilápias, Tuan et al. (2003) observaram que níveis superiores a 40 mg FB/kg de ração pode reduzir o ganho de peso, piorar a conversão alimentar além de afetar diretamente o equilíbrio dos esfingolípídios intermediários. Em bagres de um e dois anos de idade, o consumo de dietas contaminadas com 20mg FB/kg de ração provocaram alterações hepáticas como necrose e aumento no volume de hepatócitos e infiltração de linfócitos (LUMBERTDACHA et al., 1995). Para trutas, a associação de fumonisina B1 e aflatoxina B1 foi apontada como possível promotor de tumores hepáticos (CARLSON et al., 2001). Já em carpas, o tratamento com dietas contaminadas com fumonisina promoveu uma maior incidência de lesões dermatológicas bacterianas, além do aumento na contagem de eritrócitos e plaquetas, aumento nas concentrações de creatinina e bilirrubina, e aumento das atividades das enzimas aspartato e alanina aminotransferase (PEPELJNJAK et al., 2002). Outro estudo realizado em carpas atribuiu às fumonisinas um efeito neurotóxico, por gerar vacuolização, degeneração e necrose de células neurais (KOVAČIĆ et al., 2009).

Os primeiros relatos do provável mecanismo de ação das fumonisinas foram feitos por Wang et al. (1991). Estes autores demonstraram que o mecanismo de ação das fumonisinas envolve o



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

comprometimento parcial do metabolismo dos esfingolípídios por meio do bloqueio da síntese de moléculas de ceramida, que nada mais são que moléculas de esfingosina (So) ou esfinganina (Sa) ligadas a um resíduo de ácido graxo. Devido a semelhança estrutural, as fumonisinas competem diretamente com Sa e So pelo sítio de ligação da enzima CerS, bloqueando a síntese de novas moléculas de ceramida a partir de Sa, e a reversão de So à ceramida. Como consequência deste bloqueio, moléculas de Sa que se destinariam a produção de ceramida se acumulam, e as concentrações de ceramida e, conseqüentemente, de esfingolípídeos diminuem (TURNER et al., 1999).

O excesso de Sa pode ser minimizado através da sua bioconversão a esfinganina-1 fosfato (S1P) (RILEY; VOSS, 2006). O excesso de S1P pode ser prejudicial aos animais, pois participam ativamente de diversas etapas da transdução de sinal atuando como segundos mensageiros, influenciando diretamente as taxas de crescimento e divisão celular final (SPIEGEL; MERRIL JR., 1996). Excessos de S1P intracelular podem ser combatidos pela sua bioconversão irreversível a fosfoetanolamina e hexadecenal por meio da ação da enzima esfingosina - esfinganina fosfato liase (SPL) (TAHA et al., 2006). Neste contexto, é possível que a ingestão de fumonisina promova aumento na expressão do gene SPL no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura em parceria com a Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá – PR, durante os meses de dezembro/2016 e janeiro/2017. Foram utilizados 90 alevinos revertidos sexualmente para macho, pertencentes ao grupo genético GIFT x Tailandesa, com peso inicial de aproximadamente 2,5g. Os peixes foram distribuídos em três caixas de fibrocimento com volume útil de 870L cada, com sistema individual de renovação da água (15 %/dia) e aeração constante por meio de pedra porosa acoplada a um soprador central. Em cada tanque foram introduzidos quatro hapas totalizando 12 unidades experimentais com quatro tratamentos (zero 20, 40 e 60mg de fumonisina) com três repetições. Cada hapa possuirá um volume individual de 435L onde serão alojados 15 peixes, totalizando 29 L/peixe. Os peixes passaram por um período de adaptação de 30 dias antes do início do experimento.

A temperatura da água foi aferida duas vezes ao dia em cada tanque, às 9:00 e 17:00 horas. As variáveis oxigênio dissolvido e pH foram aferidas pela manhã durante todo o experimento por meio de kit individual colorimétrico.

Foram elaboradas quatro dietas isocalóricas (aproximadamente 3000 kcal de energia digestível ED/kg de dieta) e isoprotéicas (aproximadamente 33% de proteína bruta), variando apenas quanto à inclusão de diferentes níveis de fumonisina B1 (6,06mg de toxina/g de meio) + fumonisina B2 (1,35mg de toxina/g de meio). O meio de cultura foi obtido e laudado pelo laboratório de análises micotoxicológicas – LAMIC, da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. As dietas foram elaboradas considerando a concentração de FB1 + FB2, totalizando uma concentração de 7,41mg de toxina/g de meio.

Foram formados quatro grupos experimentais: GRUPO 1 – dieta controle com 0,0 mg de inclusão de FB/kg de ração; GRUPO 2 - 20 mg de inclusão de FB/kg; GRUPO 3 - 40 mg de inclusão de FB/kg; GRUPO 4 - 60 mg de inclusão de FB/kg. As concentrações de fumonisina na dieta foram avaliadas por análise laboratorial. A dieta era peletizada, seca em estufa de ventilação forçada a 55°C por 48 horas, desintegrada em moedor manual, as partículas foram classificadas de acordo com a granulometria (1 a 2mm) e distribuída manualmente três vezes/dia até saciedade aparente.

Para análise de expressão gênica, amostras de fígado de seis animais de cada tratamento, previamente anestesiados em imersão com 9 mg/L de benzocaína, foram coletadas aos 30 dias 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 RNase AWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), um inibidor de RNase. A concentração do RNA total foi medida em aparelho espectrofotômetro a um 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 utilizou-se 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, AppliedBiosystems, USA).

Os primers utilizados para avaliação do gene proteína foram desenhados com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov utilizando o site www.idtdna.com. 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 B-ACT (β actina - XM_003455949). Destes, B-ACT foi selecionado, pois apresentou melhor eficiência (entre 90 e 110%) e não variou estatisticamente entre os tratamentos.

Todas as reações foram realizadas para um volume final de $12,5 \mu\text{L}$ e em duplicatas. As curvas de dissociação foram analisadas para a verificação de qualquer presença de dímeros de primers ou produtos não específicos.

Para avaliar a expressão relativa, os dados provenientes da análise de PCR em tempo real foram transformados utilizando $2^{-\Delta\text{CT}}$, como demonstrado por Livak e Schmittgen, (2001). Os dados de expressão gênica e eficiência alimentar foram avaliados usando o procedimento REG Statement (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão gênica da enzima SPL foi significativamente alterada pelas dietas. Houve aumento significativo de SPL para os dois maiores níveis de inclusão ($P < 0,0001$) (Figura 1).

SPL 30 dias

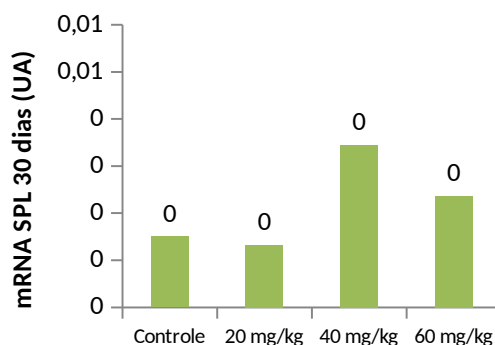


Figura 1: Efeito dos níveis de inclusão de fumonisinas nas dietas sobre a expressão gênica de SPL. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Letras minúsculas sobre as barras comparam as médias entre os períodos dentro do mesmo tratamento. Teste de Tukey para 5% de probabilidade.



Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

Aos 30 dias, foi observado um aumento da expressão da SPL em peixes que receberam dietas com 40 e 60 mg FB/kg de ração. Provavelmente, o maior tempo de consumo de fumonisina atuou sobre a ceramida sintase, promovendo acúmulo das bases esfingóides e, conseqüentemente, aumento na produção de S1P e SPL, como sugerido por Loetscheret al. (2013). De acordo com Wang et al. (1991), os sinais bioquímicos observados pelo consumo de fumonisina, como a relação esfinganina/esfingosina, a concentração de ceramida e de macromoléculas envolvidas nesta rota, são tempo e dose dependentes, corroborando com as diferenças observadas aos 15 e 30 dias de experimento.

Existe um limiar entre o comportamento celular que leva a apoptose ou a proliferação. Huang et al. (2011) sugeriram um modelo chamado de reostato de esfingolipídios, onde os níveis de ceramida/esfingosina e S1P que possuem funções opostas, são intercambiáveis dentro das células e podem direcionar para a morte celular (quando o equilíbrio se desloca em direção a ceramida/esfingosina) ou à sobrevivência e proliferação celular (quando os níveis de S1P são aumentados). Desta forma, é possível que o aumento dos níveis de SPL observados aos 30 dias seja uma tentativa do organismo para reduzir a taxa de proliferação celular por meio da catálise irreversível de S1P.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ingestão de dietas contendo níveis crescentes de fumonisinas B1 + B2 aumenta a expressão de SPL aos 30 dias de consumo.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, T.S.; PEREYRA, C.M.; SOLEIRO, C.A.; DIAS, E.O.; OLIVEIRA, A.A.; KELLER, K.M.; SILVA, P.P.O.; CAVAGLIERI, L.R.; ROSA, C.A.R. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. **International Aquatic Research**, v. 5, n. 3, 2013.

CARLSON, D.B.; WILLIAMS, D.E.; SPITSBERGEN, J.M.; ROSS, P.F.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I. AND RILEY, R.T. Fumonisin B1 Promotes Aflatoxin B1 and N-Methyl-N9-nitronitrosoguanidine Initiated Liver Tumors in Rainbow Trout. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 172, p. 29–36, 2001.

HUANG, Y.L.; HUANG, W.P.; LEE, H. Roles of sphingosine 1-phosphate on tumorigenesis. **World J Biol Chem**, v. 26; n. 2, p. 25-34, 2011.

KOVAČIĆ, S.; PEPELJNJAK, S.; PETRINEC, Z.; KLARIĆ, M.S. Fumonisin B1 neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio* L.). **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 60, p. 419-426, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001

LOETSCHER, E.; SCHNEIDER, K.; BEERLI, C.; BILLICH, A. Assay to measure the secretion of sphingosine-1 phosphate from cells induced by S1P lyase inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 12, n. 433(3), p. 345-348, 2013



X
EPCC

Encontro Internacional
de Produção Científica
24 a 26 de outubro de 2017

ISBN 978-85-459-0773-2

LUMLERTDACHA, S.; LOVELL, R.T.; SHELBYS, R.A.; LENZ', S.D.; KEMPPAINEN, B.W. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, v. 130, p. 201-218, 1995.

PEPELJNJAK, S.; PETRINEC, Z.; KOVACIC, S.; SEGVIC, M. Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio* L.) on feed amended with fumonisin B1. **Mycopathologia**, v. 156, p. 139–145, 2002.

RILEY, R.T.; VOSS, K.A. Differential Sensitivity of Rat Kidney and Liver to Fumonisin Toxicity: Organ-Specific Differences in Toxin Accumulation and Sphingoid Base Metabolism. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 335-345, 2006.

SPIEGEL, S.; MERRILL, JR, A.H. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. **FASEB J.** v.10, n. 12, p. 1388-1397, 1996.

TAHA, T.A.; MULLEN, T.D.; OBEID, L.M. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1758, n. 12, p. 2027-2036, 2006.

TUAN N.A.; MANNING, B.B.; LOVELL, R.T.; ROTTINGHAUS, G.E. Responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing different concentrations of moniliformin or fumonisin B1. **Aquaculture**, v. 217, p. 515-528, 2003.

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.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T.; MERRILL JR, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J Biol Chem.** v.5, 266(22), p. 14486-14490, 1991.

YANG, C.G.; WANG, X.L.; TIAN, J.; LIU, W.; WU F.; JIANG, M.; WEN, H. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Gene**, v. 527, p. 183–192, 2013.