DESEMPENHO PRODUTIVO E EXPRESSÃO DOS GENES MYOD E MYOG EM ALEVINOS DE TILÁPIAS DO NILO ALIMENTADOS COM DIETAS COM BASE EM PROTEÍNA DE ORIGEM VEGETAL E SUPLEMENTADA COM LISINA E/OU METIONINA

Fernanda Eleutério Miara de Almeida, João Antônio Galiotto Miranda, Paola Aparecida Paulovski Panaczevicz, Alycia Renata Rudnik, Valéria Rossetto Barriveira Furuya, Thaís Pereira da Cruz, Wilson Massamitu Furuya, e-mail: wmfuruya@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa / Departamento de Zootecnia.

Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Aquicultura

Palavras-chave: aminoácidos limitantes, aquicultura, piscicultura.

Resumo

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos da combinação da suplementação de lisina e metionina sobre o desempenho produtivo e expressão de genes relacionados com o crescimento muscular em alevinos de tilápia do Nilo. Trezentos e trinta e seis alevinos foram distribuídos aleatoriamente em 16 caixas. Foram elaboradas quatro dietas. Os peixes alimentados com as dietas suplementadas com lisina e metionina apresentaram maior peso corporal e taxa de crescimento específico. Já os peixes alimentados com dieta com lisina, apresentaram maior taxa de eficiência proteica em comparação aos peixes alimentados com as outras dietas. O índice hepatossomático e a gordura corporal foram menores nos peixes alimentados com as dietas com metionina, e lisina+metionina em comparação aos peixes alimentados com a dieta controle. Peixes alimentados com a dieta lisina+metionina apresentaram maior nível de expressão de mRNA da *MyoD*. Conclui-se que, a suplementação combinada de lisina e metionina melhora o desempenho produtivo e aumenta a expressão de mRNA de MyoD e miogenina.

Introdução

As dietas com a utilização de vegetais veem sendo usadas para buscar equilíbrio ecológico das explorações insustentáveis da farinha de peixe a partir dos recursos naturais. Utilizar ingredientes bem balanceados e nutritivos é prioridade na aquicultura para melhorar o desempenho do crescimento, a reprodução e a saúde dos peixes. Porém, a utilização de ingredientes vegetais pode ser limitada pela ocorrência de fatores nutricionais e deficiência de energia e nutrientes. A lisina e a metionina são os primeiros aminoácidos limitantes no milho e na soja. Aminoácidos cristalinos têm sido utilizados para determinar os requerimentos de aminoácidos e melhorar o valor nutritivo de dietas para peixes carnívoros e não carnívoros (NUNES et al., 2014).

A suplementação com lisina e metionina melhora o ganho de peso, a eficiência alimentar e a composição corporal dos peixes. Além disso, dietas mais sustentáveis podem ser consideradas pela suplementação de lisina e metionina devido à melhora na utilização da proteína na dieta (YUA et al., 2016). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação dietética de lisina e metionina como estratégia de alimentação, na expressão de genes relacionados ao crescimento

muscular e ao desempenho de crescimento em alevinos de tilápia do Nilo alimentadas com fontes proteicas de origem vegetal.

Material e Métodos

Foram elaboradas quatro dietas com base em farelo de milho, glúten de milho e farelo de soja como principais fontes proteicas suplementadas ou não com lisina e/ou metionina. Sendo elas, sem suplementação de lisina e metionina (controle), suplementada com lisina, suplementada com metionina e suplementada com lisina e metionina.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, durante 8 semanas. Trezentos e trinta e seis alevinos de tilápia do Nilo foram distribuídos aleatoriamente em 16 caixas. Os peixes foram alimentados até a saciedade aparente. Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados diariamente.

Ao final do experimento, todos os peixes foram mantidos em jejum por 24 h, anestesiados, eutanasiados, contados e pesados para a determinação do ganho de peso, conversão alimentar, taxa de eficiência proteína e sobrevivência. Três peixes por aquário foram coletados para expressão de genes relacionados ao crescimento muscular e mais três peixes foram coletados para determinar o índice hepatossomático. A composição corporal foi determinada de acordo com o método padrão (AOAC, 1995). A umidade foi determinada por secagem em estufa até peso constante. O lipídeo bruto (CL) foi determinado pelo método de extração com éter utilizando um extrator Soxhlet (Tecnal, TE-044, Piracicaba, SP, Brasil). A proteína bruta (PB) (N x 6,25) foi determinada pelo método de Kjeldahl (Tecnal, MA-036, Piracicaba, SP, Brasil) após hidrólise ácida. A cinza foi determinada pela combustão em forno de mufla; Os perfis de aminoácidos das dietas foram determinados por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (Hitachi, Tóquio, Japão).

Foram coletadas amostras de músculo branco dorsal com aproximadamente 1,0 cm atrás do arco branquial. O RNA total foi extraído de amostras musculares de três peixes por aquário, usando o TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A integridade do RNA extraído foi observada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com SYBR Safe (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). As amostras de RNA foram quantificadas usando o NanoDropTM 2000 (Thermo Fishcer Scientific) a 260 nm de absorvência.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total utilizando o kit de cDNA (Applied Biosystems Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativo (qRT-PCR) foi realizada em um termociclador StepOneTM Sistema de PCR em Tempo Real Applied BiosystemsTM (Applied Biosystems Life Technologies).

Os parâmetros foram calculados desse modo: Taxa de crescimento específico (% / dia) = 100 x [ln peso final (g) - ln peso inicial (g)] / duração experimental (dias); Consumo de ração = ração seca consumida (g) / número de peixes; Relação de conversão alimentar = alimento seco consumido (g) / ganho de peso (g); Relação de eficiência proteica = ganho de peso corporal (g) / consumo proteico (g); Índice hepatossomático (%) = 100 x peso do fígado (g) / peso corporal (g); Sobrevivência (%) = 100 x número de peixes no final da experiência / número de peixes no início da experiência.

Os dados foram apresentados como média ± SEM e sujeitos à análise de variância (ANOVA) para testar os efeitos das dietas utilizando o pacote estatístico

ISSN 1676-0093

SPSS (versão 13.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA). Teste de Tukey's com nível de significância de P <0,05 foram usados para comparar as médias de tratamento.

Resultados e Discussão

Peixes alimentados com a combinação de lisina e metionina apresentaram maior peso corporal final e crescimento que peixes alimentados com outras dietas. Entretanto, não houve diferenças entre o peso corporal final e a taxa de crescimento entre peixes alimentados com lisina e metionina. Não apresentou diferenças no consumo de ração e sobrevivência entre todos os tratamentos. A relação de eficiência protéica foi significativamente melhor em peixes alimentados com a dieta suplementada com lisina. A taxa de eficiência proteica foi significativamente melhor nos peixes alimentados com a dieta suplementada com lisina em comparação as outras dietas. Os peixes alimentados com a dieta controlem apresentaram menor taxa de eficiência proteíca. O índice hepatossomático foi menor em peixes alimentados com metionina isolada e com dietas combinadas de lisina e metionina. A umidade do corpo inteiro, a proteína bruta e a cinza não foram afetada. Entretanto, os peixes alimentados com metionina e dietas combinadas de lisina e metionina mostraram redução dos teores de lipídios brutos na composição corporal.

A expressão do mRNA de MyoD e miogenina foi afetada pelos tratamentos dietéticos avaliados. Contudo, a expressão de miostatina no mRNA não foi afetada pela suplementação de lisina, metionina ou metionina e lisina combinadas. O nível de expressão de mRNA em peixes alimentados com a dieta controle foi menor do que o observado na dieta suplementada com lisina e metionina. Entretanto, não foram observadas diferenças nas dietas isoladas de lisina e metionina. A expressão de RNAm da miogenina foi maior em peixes alimentados com dieta com lisina e metionina, compara com as outras dietas. No entanto, a expressão de miogenina nas dietas controle e suplementadas com lisina não foi afetada. Do mesmo modo, a expressão da miostatina não foi afetada pelos tratamentos dietéticos avaliados.

No presente estudo, a lisina e a metionina mostraram sua importância na elaboração de dieta balanceada para alcançar o máximo desempenho de crescimento para peixes. Entretanto, os peixes alimentados com a dieta combinada de lisina e metionina apresentaram um melhor crescimento em comparação com os peixes alimentados com dietas suplementadas com lisina e metionina.

A lisina e metionina são os primeiros aminoácidos limitantes em milho e farelo de soja. Devido à presença limitante, os requisitos de lisina na dieta foram determinados com base na proteína de milho e / ou coprodutos, enquanto a exigência de metionina foi determinada utilizando soja e coprodutos como principal fonte de proteína (WANG et al., 2005; ZHOU et al., 2010).

Poucos estudos foram feitos para avaliar os efeitos da combinação da suplementação de lisina e metionina para tilápia do Nilo alimentados com dietas de todos os vegetais. Neste estudo, farinha de glúten de milho foi usada para reduzir os teores quantitativos de lisina, porém, esse ingrediente é rico em metionina e ocasionou uma menor deficiência quantitativa de metionina na dieta controle, em comparação com a observada para a lisina.

O uso de aminoácidos cristalinos na alimentação aquática tem sido amplamente utilizado para determinar as exigências de lisina e metionina em peixes.

No presente estudo, a umidade corporal total e o teor de proteína não foram afetados pelos tratamentos dietéticos avaliados. No entanto, o índice hepatossomático e os lipídios corporais foram afetados pela suplementação de lisina e metionina, semelhante ao observado em dietas à base de plantas alimentadas

ISSN 1676-0093

com bacalhau-do-Atlântico suplementadas com aminoácidos cristalinos. (HANSEN et al., 2011).

No presente trabalho, as expressões de MyoD, miogenina e miostatina foram afetadas pelos tratamentos dietéticos. Até o momento, esta é a primeira menção de experimento avaliando a expressão de genes relacionados ao crescimento muscular de alevinos de tilápia do Nilo alimentados com dietas combinadas de lisina e metionina. Os peixes alimentados com dieta suplementada com lisina e metionina aumentaram a expressão dos níveis de miogenina em comparação com peixes alimentados com outras dietas, indicando alta taxa de proliferação celular e diferenciação relacionada ao processo ativo hiperplásico e hipertrófico no crescimento muscular (LEVESQUE et al., 2007).

Conclusões

A combinação de lisina e metionina afetou na melhora do desempenho produtivo, no aumento da expressão de mRNA de *MyoD miogenina*, com redução no conteúdo de gordura corporal de alevinos de tilápias do Nilo.

Referências

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th. ed. AOAC Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

NUNES, A. J. P.; SÁ, M. V. C.; BROWDY, C. L.; VAZQUEZ-ANON, M. Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. **Aquacultur**e, v. 431, p. 20-27, 2014.

LEVESQUE, H.M.; SHEARS, M.A.; FLETCHER, G.L.; MOON, T.W. Myogenesis and muscle metabolism in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) made transgenic for growth hormone. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, p.128–137, 2007.

YUN, H.; PARK, G.; OK, I.; KATYA, K.; HUNG, S.; & BAI, S.C. Determination of the dietary lysine requirement by measuring plasma free lysine concentrations in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after dorsal aorta cannulation. **Fisheries and Aquatic Sciences**, v.19, n. 4, p.1–7, 2016.

ZHOU, F.; SHAO, J.; XU, R.; MA, J.;XU, Z. Quantitative l-lysine requirement of juvenile black sea bream (*Sparus macrocephalus*). **Aquaculture Nutrition**, v.16, n.2, p. 194–204, 2010.

HANSEN, A.-C.; HEMRE, G.-I.; KARLSEN, O.; KOPPE, W. Quantitative dietary lysine requirement of juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. **Aquaculture**, v.249, n.2, p.419–429, 2011.