EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO DA METIONINA DE TILÁPIAS

Thaís Pereira da Cruz (PIBIC/CNPq/UEPG), Mariana Michelato, Valéria Rosseto Barriviera Furuya, Wilson Massamitu Furuya (Orientador), e-mail: wmfuruya@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Zootecnia.

Ciências Agrárias, Piscicultura

Palavras-chave: aminoácidos, expressão de gene, desempenho de crescimento.

Resumo

Os efeitos da metionina e taurina sobre o desempenho produtivo e expressão de genes de enzimas relacionadas com metabolismo de aminoácidos sulfurados foram avaliados em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Duas dietas adicionais foram incluídas para avaliar os efeitos do excesso de taurina e metionina (MET) ou proteína da farinha de peixe (FP controle) sobre o metabolismo analisadas por meio de contrastes ortogonais. Todas as dietas experimentais foram isoproteica e isoenergética e fornecidas a grupos em triplicatas de 15 peixes. Foi observado crescimento reduzido em peixes alimentados com dietas contendo níveis inadequados de metionina sem suplementação de taurina (dieta ST). Os níveis mais altos de mRNA dos genes *S-adenosylhomocysteinase* (ACHY) e *cystathione β-synthase* (CBS) foram observados em peixes alimentados com deficiência de metionina com ou sem suplementação de taurina. Em conclusão, suplementação de taurina demonstrou um efeito poupativo sobre a exigência de metionina para tilápias do Nilo.

Introdução

A metionina desempenha importante papel na síntese e também como um doador de metil e fonte de enxofre, sendo exigida para biossíntese cisteína e taurina. As enzimas S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilhomocisteína (SAH) estão envolvidas na manutenção de grupos metil no tecido hepático (Kwasek et al., 2014). Por sua vez, SAH é hidrolisada por S-adenosilhomocisteínase (ACHI) para formar homocisteína, a qual tem dois destinos metabólicos: forma a metionina pela remetilação ou entra na rota da transsulforação para produzir cisteína (Tang et al., 2010). A rota de transsulforação é uma reação irreversível combinando cistationina β-sintase (CBS) e cistatione Ɣ-liase (CYL), resultando na formação de cistationina para homocisteína e cisteína para cistationina, respectivamente (Brosnan et al., 2006). Taurina (ácido 2-aminoetilsulfonico) é sintetizada em cisteína, principalmente pela cisteína dioxigenase (CDO)/cisteína ácido sulfônico descarboxilase (CSD)-rota dependente, a principal rota para biossíntese de taurina em mamíferos (Jurkowska et al., 2016). Nessa rota, cisteína é oxidada para cisteína ácido sulfônico por CDO em cisteína ácido sulfônica é descarboxilada para hipotaurina pelo CSD, assim taurina é sintetizada a partir de hipotaurina (Haga et al., 2015; Salze et al., 2016). Essas duas enzimas são caracterizadas como enzimas chave por que elas catalisam passos limitantes de taxa, desempenhando um importante papel

regulatório na biossíntese de taurina (Stipanuk et al., 2002). Estudos envolvendo taurina e genômica foram conduzidos especialmente com peixes marinhos, que tem demonstrado habilidades limitadas para síntese de taurina (Haga et al., 2015; Wang et al., 2014, 2016; Watson et al., 2014). Entretanto, a avaliação da suplementação de taurina em peixe de água doce é necessária, pois existem poucas informações em peixes de água doce.

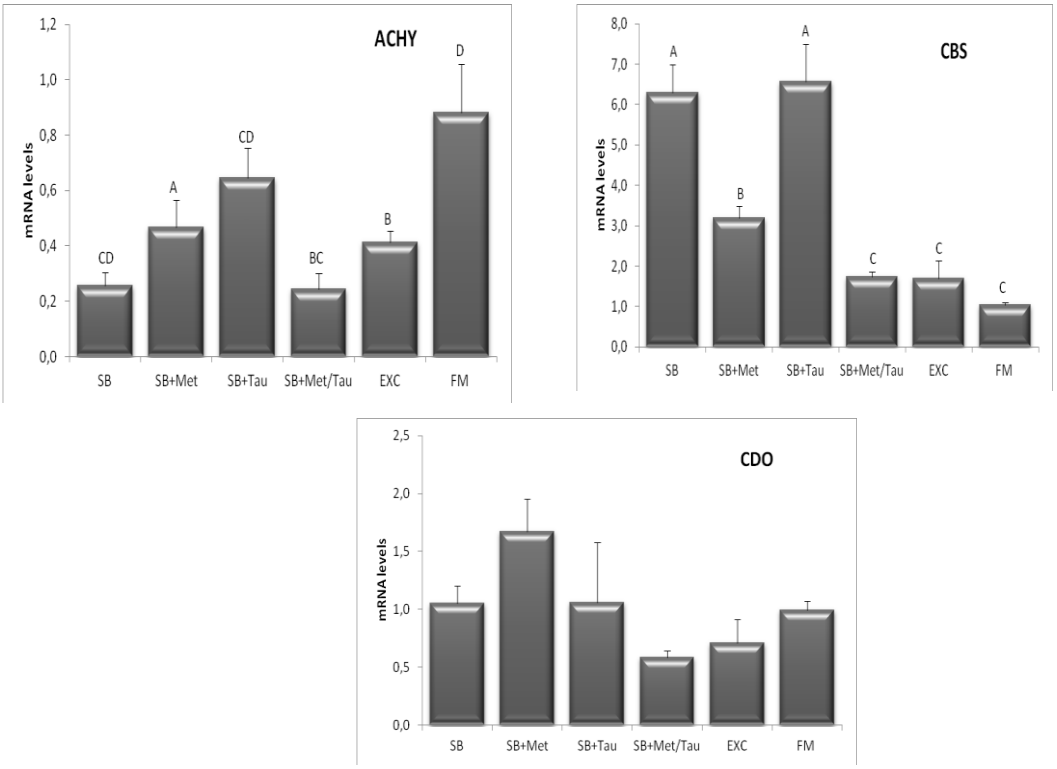
Materiais e Métodos

Um ensaio de alimentação de 8 semanas foi conduzido na Universidade de Pesquisa em Aquicultura do Texas A&M em sistema de recirculação. Duzentos e setenta juvenis de Tilápia do Nilo (peso inicial 6,70 ± 0,08 g) foram distribuídas aleatoriamente em 18 aquários, 110-L a uma densidade de 15 peixes por aquário com três tanques em replicatas por dieta. Os peixes foram alimentados duas vezes diariamente com base em 5% biomassa e pesados a cada 2 semanas. Seis dietas experimentais foram formuladas para conter 313,3 g de proteína bruta g/kg e 3872,0 kcal g/kg de energia bruta. Exceto para a dieta com farinha de peixe (FM controle), todas dietas experimentais foram elaboradas com ingredientes com base em farelo de soja, suplementadas ou não com DL-metionina e/ou L-taurina cristalina em um delineamento fatorial 2x2. As dietas e tratamentos foram elaboradas como se segue: dieta FS (nível inadequado de taurina - sem suplementação de taurina); FS+Met (nível adequado de metionina sem suplementação de taurina); FS+Tau (nível inadequado de metionina com suplementação de taurina) e FS+Met/Tau (nível adequado de metionina com suplementação de taurina). Uma dieta formulada com base em proteína da soja contendo níveis excessivos de metionina e taurina além dos requerimentos (nomeada EXC), também foi formulada. Parâmetros de qualidade de água foram monitorados diariamente. Os peixes foram eutanaziados com metanossulfonato de tricaína (MS-222; Western Chemical, INC., Ferndale, WA) e pesados individualmente e retiradas amostras depois de 2 horas após a última refeição. Umidade, proteína bruta e cinzas foram analisadas de acordo com métodos padrões (AOAC, 2005). Lipídios totais foram determinados por metodologia descrita por Folch et al. (1957). O RNA total foi extraído do tecido do fígado usando TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com o protocolo de fabricação. Os pares de iniciadores para S-adenosilhomocysteinase - AHCY, cistatina β-sintase - CBS, cisteína dioxigenase - CDO e 18S DNA ribossomal (rDNA) foram desenhados com referência à sequência de nucleótidos de ADNc de Oreochromis miloticus, disponível em GenBank (http: // www .ncbi.nlm.nih.gov / pubmed / nucleotide). Dados foram analisados por ANOVA de duas vias usando o procedimento GLM de SAS (SAS, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) com significância definido em $P \leq 0.05$. Em caso de interação significante, o teste de Tukey de múltipla variedade foi aplicado para comparar as diferenças entre os principais tratamentos. Adicionalmente, contrastes ortogonais foram desenvolvidos para comparar combinações específicas de tratamentos (FM controle *vs.* SB+Met/Tau e SB+Met *vs.* EXC).

Resultados e Discussão

A suplementação de metionina e taurina dietética apresentou efeitos interativos significante no desempenho produtivo. Valores de menor peso corporal, ganho de peso e eficiência alimentar foram observados em peixes alimentados com a dieta SB

a qual foi atribuída a deficiência de metionina, enquanto que não foram observadas diferenças sobre desempenho de crescimento para peixes das dietas FS+Met, FS+Tau e FS+Met/Tau. Ao contrário, o consumo alimentar foi maior (P = 0.031) em peixes alimentados com a dieta FS+Met/Tau comparando com aqueles alimentados com dieta FS. Menor retenção de proteína (P = 0.070) foi observada em peixes alimentados com dieta FS. Entretanto, não foi observada interação significativa. Por meio dos resultados dos contrastes ortogonais observou-se que peixes alimentados com dieta controle FP apresentaram maior ganho de peso, eficiência alimentar e indice Hepatossomático comparado aos peixes alimentados com a dieta FS+Met/Tau; contudo, não foram observadas diferenças na retenção de proteína (P = 0.101) e taxa de gordura visceral (P = 0.110).



.

Figura 1 - Expressão de genes de S-adenosilhomocisteinase (ACHY), cistationa β-sintetase (CBS) e cisteina dioxigenase (CDO) no fígado de tilápias do Nilo.

Conclusões

Em conclusão, a suplementação de taurina dietética demonstrou efeito poupativo na exigência de metionina da Tilápia do Nilo alimentados com dietas baseadas na soja. Em peixes, o gene CBS é muito responsivo a suplementação de metionina enquanto CDO não é responsivo a suplementação de taurina dietética.

Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento e fomento da bolsa, ao meu orientador Dr. Wilson Massamitu Furuya, Dra. Valéria Rossetto Barriveira Furuya e Dra. Mariana Michelato, e aos colegas de grupo pelo apoio.

Referências

AOAC: **ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. OFFICIAL MEHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. 17th etd., AOAC International, Arlingtion,** 2000. Disponível em: https://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imis/AOAC_Member/Default.aspx?WebsiteKey=2e25ab5a-1f6d-4d78-a498-19b9763d11b4&hkey=8fc2171a-6051-4e64-a928-5c47dfa25797

BROSNAN, J.T., BROSNAN, M.E., 2006. **The The sulfur-containing amino acids: an overview. J Nutr.** Jun;136(6 Suppl):1636S-1640S

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; 1957. **J. Biol. Chem.** 226, 497.

HAGA, Y., KONDO, H., KUMAGAI, A., SATOH, N., HIRONO, I., SATOH, S., 2015. **Isolation, molecular characterization of cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSD) of red sea bream Pagrus major and yellowtail Seriola quinqueradiata and expression analysis of CSD from several marine fish species.** Aquaculture. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.04.004

JURKOWSKA, H., NIEWIADOMSKI, J., HIRSCHBERGER, L.L., ROMAN, H.B., MAZOR, K.M., LIU, X., LOCASALE, J.W., PARK, E., STIPANUK, M.H., 2016. **Downregulation of hepatic betaine:homocysteine methyltransferase (BHMT) expression in taurine-deficient mice is reversed by taurine supplementation in vivo.** Amino Acids 48, 665–676. doi:10.1007/s00726-015-2108-9

KWASEK, K., TEROVA, G., LEE, B.J., BOSSI, E., SAROGLIA, M., DABROWSKI, K., 2014. **Dietary methionine supplementation alters the expression of genes involved in methionine metabolism in salmonids.** Aquaculture. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.05.031

TANG, B., MUSTAFA, A., GUPTA, S., MELNYK, S., JAMES, S.J., KRUGER, W.D., 2010. **Methionine-deficient diet induces post-transcriptional downregulation of cystathionine ??-synthase.** Nutrition. doi:10.1016/j.nut.2009.10.006

SALZE, G.P., SPANGLER, E., COBINE, P.A., RHODES, M., DAVIS, D.A., 2016. **Investigation of biomarkers of early taurine deficiency in Florida pompano *Trachinotus carolinus.*** Aquaculture 451, 254–265. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.09.019

STIPANUK, M.H., LONDONO, M., LEE, J.-I., HU, M., YU, A.F., 2002. **Enzymes and Metabolites of Cysteine Metabolism in Nonhepatic Tissues of Rats Show Little Response to Changes in Dietary Protein or Sulfur Amino Acid Levels.** J. Nutr. 132, 3369–3378.

WANG, Q., HE, G., WANG, X., MAI, K., XU, W., ZHOU, H., 2014**. Dietary sulfur amino acid modulations of taurine biosynthesis in juvenile turbot (*Psetta maxima)*.** Aquaculture 422–423, 141–145. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.12.014

WANG, X., HE, G., MAI, K., XU, W., ZHOU, H., 2016. **Differential regulation of taurine biosynthesis in rainbow trout and Japanese flounder**. Sci. Rep. 6, 21231. doi:10.1038/srep21231

WATSON, A.M., BARROWS, F.T., PLACE, A.R., 2014. **Effects of Graded Taurine Levels on Juvenile Cobia.** N. Am. J. Aquac. 76, 190–200. doi:10.1080/15222055.2014.899531.