EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO CRESCIMENTO MUSCULAR DE TILÁPIAS ALIMENTADAS COM DIFERENTES NÍVEIS DE HISTIDINA

Paola Aparecida Paulovski Panaczevicz (PIBIC/ UEPG), Wilson Massamitu Furuya (Orientador), e-mail: wmfuruya@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Zootecnia.

Aquicultura, Piscicultura

Palavras-chave: Aminoácido, genômica, nutrição

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão dos genes relacionados ao crescimento muscular (MyoD, miogenina e miostatina) em alevinos de tilápias do Nilo alimentados com diferentes níveis de histidina. Foram utilizados 540 alevinos de tilápia do Nilo com peso médio inicial (4,84 ± 0,04 g), distribuídos em 18 caixas de fibra de vidro com capacidade de 250 litros, em um delineamento inteiramente casualizado sendo seis tratamentos, três repetições e trinta peixes por unidade experimental, por um período de 110 dias. Seis dietas com 265,7 g/kg de proteína bruta e 3821,41 kcal/kg de energia bruta contendo níveis crescente de inclusão de histidina (4,2; 5,4; 7,1; 8,9; 9,8; 11,5 g/kg da matéria seca) foram elaboradas. A suplementação de 9,8 g/kg de histidina na dieta proporcionou maior expressão dos níveis de mRNA da MyoD. Contudo, a expressão dos níveis de mRNa da miogenina foi mais elevada nos peixes que receberam as dietas contendo 9,8 e 11,5 g/kg de histidina. A expressão da miostatina não foi influenciada pelos níveis de histidina da dieta. Concluiu-se que histidina influencia expressão dos genes MyoD e miogenina, mas não afeta a apressão da miostatina A utilização de 9,8 g/kg de histidina maximiza a expressão dos genes MyoD e miogenina.

Introdução

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe teleósteo pertencente à família Cichlidae, sendo originária do continente africano, mais precisamente da Bacia do Rio Nilo.

A histidina é considerada um aminoácido essencial e desempenha diversas funções biológicas e catalíticas vitais no organismo (Wu, 2013). O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão dos genes MyoD, miogenina e miostatina de alevinos e juvenis de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de histidina;

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a junho de 2014 no Laboratório de Aquicultura do Grupo de Estudos em Manejo na Aquicultura – (GEMAq), da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Campus Toledo, e foi aprovado pelo Comitê de Ética da mesma instituição (Protocolo Nº05/14). Foram utilizadas 540 tilápias (4,80 ± 0,07 g), distribuídas em caixas de fibra de vidro circulares com capacidade de 250 litros, sendo cada unidade composta por 30 peixes. O oxigênio dissolvido (5,97 ± 0,28 mg L -1), temperatura (28,22 ± 0,88 °C), pH 7,12±0,19 e a condutidade elétrica (108,24±6,32 µS.cm -1) foram mantidos dentro da faixa de valor de conforto para tilápias do Nilo .

Foram elaboradas seis dietas com 265,75 g/kg de proteína bruta e 3821,41 kcal/kg de energia bruta com níveis crescentes de suplementação de L -histidina de 0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,1 e 7,6 g kg -1 , em que foram obtidas dietas com 4,2; 5,4; 7,1; 8,9; 9,8 e 11,5 g/kg de histidina em substituição a L-alanina, seguindo às recomendações propostas por Furuya (2001) e NRC (2011) para o atendimento das exigências nutricionais de alevinos de tilápia do Nilo.

Os ingredientes selecionados foram moídos individualmente em moedor tipo martelo com peneira de malha 0,3 mm de diâmetro. Posteriormente, as rações foram processadas de maneira extrusada com diâmetros de aproximadamente 2,0 mm. O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia (8h00, 11h00, 14h00 e 17h00) até a saciedade aparente, por um período de 110 dias. Ao final do experimento, os peixes foram mantidos em jejum por 24 horas, para esvaziamento do trato gastrointestinal e, posteriormente, para coleta de sangue, foram anestesiados com benzocaína (100 mg/L de água).

As análises da expressão dos genes foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural, Molecular e Genética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa –PR, sendo coletados fragmentos da musculatura branca dorsal, dos mesmos peixes utilizados para análise de fibra muscular, as amostras foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer – 80 o C até o processamento. A expressão dos genes da MyoD, miogenina e miostatina foram realizadas por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real após transcrição reversa (RT-q PCR), seguindo as orientações do MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment (Bustin, 2009).

O RNA total das amostras congeladas foi extraído com TRIzolTM (Invitrogen Life Technologies), seguindo-se o protocolo do fabricante.Para verificar a integridade do RNA obtido, 1 µL de solução de RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração de RNA, em ng/µL, foi determinada através de espectrofotômetro a 260 nm de absorbância. A pureza do RNA foi confirmada pela obtenção da razão entre as absorbâncias 260/280 nm igual a 2. Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o High Capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems Life Technologies), seguindo-se as instruções do fabricante, e o DNA complementar (cDNA) resultante foi armazenado em freezer a -20°C e utilizado nas reações de RT-qPCR. Os níveis de expressão dos genes alvo MyoD e miogenina foram detectados por RT-qPCR através do sistema Rotor Gene-Q (Qiagen). Os resultados de expressão, obtidos para esses genes, foram normalizados pelos valores obtidos para o gene de referência 18S ribosomal DNA (18SrDNA).

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando-se o Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. Um conjunto de primers senso e antisenso, para cada gene analisado, foi construído através do software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems Life Technologies), a partir das sequências de RNAm descritas para a tilápia e publicadas no GenBank (números de acesso: MyoD 1: GU246722.1; miogenina: GU246725.1, 18S ribosomal DNA (18SrDNA). Todos os conjuntos de primers foram sintetizados pela s.

As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, utilizando-se as condições de termociclagem: 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Ao término de cada reação, a amplificação específica de cada gene foi confirmada pela análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada

pelo Método do CT, após sua validação, e foi dada pela fórmula 2-ΔΔCT, conforme metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Resultados e Discussão

A expressão dos níveis de mRNA da MyoD e miogenina foram influenciados (P<0,05) pelos níveis de histidina no músculo branco (Figura 1). Contudo, a expressão dos níveis de mRNA da miostatina não foi influenciada (P > 0,05) com a suplementação de histidina na dieta. A suplementação de 9,8 g/kg de histidina na dieta proporcionou uma maior expressão (P < 0,05) dos níveis de mRNA da MyoD, quando comparada com os tratamentos contendo 4,2, 5,4, 7,1, 8,9 e 11,5 g/kg de histidina. De forma semelhante, foi observada maior expressão (P < 0,05) nos níveis de mRNA da miogenina para os peixes que receberam as dietas contendo 9,8 e 11,5 g/kg de histidina, porém, não diferindo estatisticamente dos peixes que consumiram a dieta com 8,9 g/kg de histidina. A menor expressão dos níveis de mRNA da miogenina, foi observada nos peixes que consumiram as dietas com 4,2 a 7,1 g/kg de histidina.

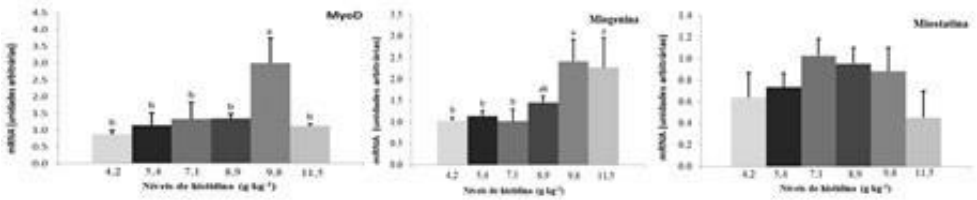


Figura 1 Quantificação da MyoD, miogenina e miostatina realizado no tecido muscular esquelético branco da tilápia do Nilo (O. niloticus) detectados por RT-qPCR. Barras representam médias ± Desvio padrão para cada tratamento (n=9) Letras distintas indicam diferença significativa a nível de (P>0,05) de significância pelo teste de Tukey.

Os níveis de mRNA da miostatina foram menores em todos os tratamentos em comparação com os níveis mRNA da MyoD e miogenina, não sendo observada diferenças significativas nos níveis de mRNA da miostatina entre os tratamentos. Dessa forma, nota-se que a adequada suplementação de histidina inibiu a expressão da miostatina, melhorando o desempenho produtivo dos peixes durante o período experimental.

A miostatina desempenha papel de forma negativa na regulação da miogênese, pois silencia a ativação dos fatores de transcrição (JOHANSEN; OVERTURF, 2005). Nebo et al. (2013), avaliando a expressão de genes relacionados ao crescimento muscular durante a restrição alimentar e realimentação em juvenis de tilápia do Nilo, observaram um aumento na expressão da miostatina, após um curto período de jejum. Após a realimentação, os níveis da miostatina diminuíram, enquanto que um aumento na expressão da MyoD foi observado, sendo possível inferir que em condições normais de alimentação a expressão da miostatina permanece baixa.

Alami-Durante et al. (2010), testando duas dietas com diferentes fontes de vegetais e aminoácidos para juvenis de truta arco-íris, (*Oncorhyncus mykiss)* observaram maior expressão do MyoD no músculo branco nos peixes que receberam a dieta controle. Contudo, a expressão da MyoD no músculo vermelho não apresentou alterações nos animais que receberam ambas as dietas. Demonstrando que as diferentes fontes de aminoácidos fornecidas na dieta podem influenciar na expressão de genes músculo específico.

Conclusões

Os resultados desse estudo, demonstraram que os níveis de histidina dietéticos, podem influenciar o ganho em peso, a conversão alimentar, taxa de eficiência

proteica, expressão dos genes MyoD, miogenina, e a frequência de distribuição das fibras musculares de tilápias do Nilo nessa fase de estudo. A partir do ajuste dos dados ao modelo de regressão polinomial de segundo grau, a exigência de histidina foi estimada em 8,1g kg -1, correspondente a 3,05% da proteína bruta da dieta.

Agradecimentos
Minha gratidão a Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), pela bolsa de estudos concedida. Agradeço ao meu orientador Wilson Massamitu Furuya pelas correções e incentivos. Agradeço aos integrantes do Grupo de Pesquisa UEPG Fish Nutrition e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão.

Referências
ALAMI-DURANTE, H.; WRUTNIAK-CABELLO, C.; KAUSHIK, S. J.; MÉDALE, F. Skeletal muscle cellularity and expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chains in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of changes in dietary plant protein sources and amino acid profiles. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 156, n. 4, p. 561–568, 2010.
FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; MIRANDA, E. C. de; FURUYA, V. R. B.; BARROS, M. M. Coeficientes de digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alguns ingredientes pela tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus* (L.) (linhagem tailandesa). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, n. 1996, p. 465–469, 2001.
JOHANSEN, K. A.; OVERTURF, K. Quantitative expression analysis of genes affecting muscle growth during development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Marine Biotechnology**, v. 7, p. 576–587, 2005.
LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
NEBO, C.; CÉLIA, M.; REGINA, F.; LOSI, F.; ALMEIDA, A. de; ROBERTO, C.; FRANCISCO, R.; DAL-PAI-SILVA, M. Comparative Biochemistry and Physiology , Part B Short periods of fasting followed by refeeding change the expression of muscle growth-related genes in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 164, p. 268–274, 2013.
NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington: National Academy Press, 2011.
WATABE, S. Myogenic regulatory factors. In: JOHNSTON, I. A. (Ed.). **Muscle Development and Growth**. London: Academic Press, 2001. p. 19–41.
WU, G. Functional amino acids in nutrition and health. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 407–411, 2013.