

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**FUMONISINA E SEUS EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO
DOS GENES IGF-I, GHR, SPL, CASP-7 E
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO EM TILÁPIA-
DO-NILO**

Autora: Stefânia Caroline Claudino da Silva
Orientadora: Dra. Eliane Gasparino

MARINGÁ
Estado do Paraná
junho - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**FUMONISINA E SEUS EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO
DOS GENES IGF-I, GHR, SPL, CASP-7 E
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO EM TILÁPIA-
DO-NILO**

Autora: Stefânia Caroline Claudino da Silva
Orientadora: Dra. Eliane Gasparino

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
junho – 2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S586f	<p>Silva, Stefânia Caroline Claudino da Fumonisina e seus efeitos sobre a expressão do genes IGF-I, SPL, CASP-7 e características de desempenho em tilápia-do-Nilo/ . -- Maringá, 2015. 88 f. : il. , figs. , tabs.</p> <p>Orientadora: Prof.a. Dr.a. Eliane Gasparino. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2015.</p> <p>1. Tilápia-do-Nilo - Crescimento corporal. 2. Tilápia-do-Nilo - Apoptose. 3. Tilápia-do-Nilo - Expressão gênica. 4. Tilápia-do-Nilo - Metabolismo. 5. Tilápia-do-Nilo - Fumonisinias. I. Gasparino, Elaine, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.</p> <p>CDD 22. ED.639.37 JLM000638</p>
-------	--



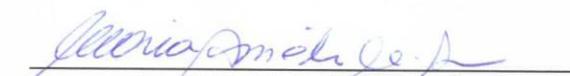
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

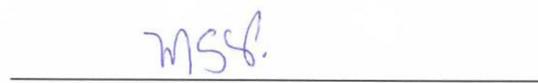
**FUMONISINA E SEUS EFEITOS SOBRE A
EXPRESSÃO DOS GENES IGF-I, RGH, SPL,
CASP-7 E CARACTERÍSTICAS DE
DESEMPENHO EM TILÁPIA-DO-NILO**

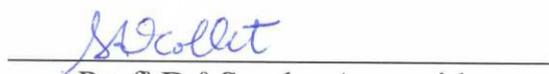
Autora: Stefânia Caroline Claudino da Silva
Orientadora: Profª Drª Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 19 de junho de 2015.


Profª Drª Maria Amélia
Menck Soares


Profª Drª Magali Soares dos
Santos Pozza


Profª Drª Sandra Aparecida
Oliveira Collet


Dr. Christiano Rodrigues
Schamber


Profª Drª Eliane Gasparino
(Orientadora)

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

(Martin Luther King)

Aos meus pais, Luzia e David, por plantarem este sonho em minha vida,
Aos meus irmãos, Rafael e Artur, por acreditarem na realização deste sonho,
À memória do meu amado sobrinho Heitorzinho, pelas lições de vida ensinadas,
Ao meu esposo, Alexander, por participar com muito esforço e perseverança,
Ao meu filho, David Claudino da Silva Neto, por me inspirar a cada dia.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que este sonho fizesse parte de seus planos para mim, por me amar, e nunca me abandonar.

A Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES pela bolsa a mim concedida.

A minha família, por ser meu pilar, meu sustento.

A minha orientadora, Eliane Gasparino, pela orientação e ensinamentos.

Ao Carlos Souza do Nascimento, pela coorientação, paciência e ensinamentos.

Ao Christiano Rodrigues Schamber, pela parceria, paciência e direcionamentos.

Aos amigos, Daniele Portela, Fernanda Tanamati, Bruno Lala, Natália Mora, Guilherme Schuroff e André Garcia, companheiros de todas as horas.

Ao Sr. Claudemir Martins Soares e ao Sr. José Trentin, pelas prestimosas colaborações.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

STEFÂNIA CAROLINE CLAUDINO DA SILVA, filha de David Claudino da Silva e Luzia Oliveira Pinto da Silva, nasceu em 31 de julho de 1985, em Maringá no estado do Paraná.

Em janeiro de 2010 graduou-se em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá, com defesa do trabalho intitulado “Frequência alélica e genotípica do gene DGAT1 em uma população de bovinos leiteiros”, sob orientação da Prof^a. Dra. Eliane Gasparino.

Em Março de 2012, obteve o título de Mestre em Zootecnia, com a dissertação intitulada “Glicerol na dieta de codornas: Expressão de mRNA dos genes mitocondriais e de crescimento” sob orientação da Prof^a. Dra. Eliane Gasparino e co-orientação da Prof^a. Dra. Simara Márcia Marcato.

Em Março de 2015, submeteu-se a exame de qualificação como pré requisito para obtenção do título de Doutora em Zootecnia, com o trabalho intitulada “Desafio com fumonisina sobre características de desempenho e moleculares em tilápia-do-Nilo” sob orientação da Prof^a. Dra. Eliane Gasparino, e obteve nota 9,3.

Em Junho de 2015, submeteu-se a defesa de tese para obtenção do título de Doutora em Zootecnia, com a Tese intitulada “Fumonisina e seus efeitos sobre a expressão dos genes IGF-I, GHR, SPL, CASP-7 e características de desempenho em tilápia-do-Nilo” sob orientação da Prof^a. Dra. Eliane Gasparino.

ÍNDICE

	Pg.
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xviii
Resumo	viii
Abstract	viii

Capítulo I Revisão de literatura

Introdução

Contaminação do milho por micotoxinas	vii
Toxicidade das fumonisinas nos animais.....	04
Mecanismo de ação das fumonisinas: redução de ceramida	05
Esfingolipídios	07
Apoptose: morte celular programada.....	08
Fumonisinase e equilíbrio apoptótico.....	09
Esfingosina fosfato liase - SPL	11
Esfingolipídios, fumonisina e o crescimento celular	12
Receptor do hormônio do crescimento (GHR).....	14
Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)	14

Hipótese geral da tese	15
Referências	16
Objetivos gerais.....	23

Capítulo II

Desafio com fumonisina B1 + B2 promove alteração na expressão de mRNA de IGF-1 e GHR no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo

Resumo	25
Abstract	25
Introdução	26
Material e métodos	27
Resultados	32
Discussão	34
Conclusão.....	38
Referências.....	39

Capítulo III
Expressão gênica de IGF-1 e GHR em tilápias-do-Nilo de diferentes idades
desafiadas com fumonisina B1 + B2

Resumo	45
Abstract	45
Introdução	46
Material e métodos	47
Resultados	51
Discussão	52
Conclusão.....	54
Referências.....	55

Capítulo IV
Ação das fumonisinas B1 + B2 sobre a expressão de genes relacionados ao
equilíbrio apoptótico em alevinos de tilápia-do-Nilo

Resumo	60
Abstract	60
Introdução	61
Material e métodos	62
Resultados	67
Discussão	70
Conclusão.....	73
Referências.....	74
Instruções aos autores	79

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I - Revisão de literatura

Figura 01 - Milho contaminado com fungo da espécie <i>Fusarium proliferatum</i>	02
Figura 02 - Estrutura química de moléculas de fumonisina B1, B2 e B3.....	03
Figura 03 - Estrutura da molécula de ceramida	05
Figura 04 - Semelhança estrutural entre fumonisina B1, esfinganina e esfingosina	06
Figura 05 - Mecanismos inibição de síntese de ceramida por fumonisinas	06
Figura 06 - Estrutura da molécula de esfingolipídio.....	07
Figura 07 - Relação entre ceramida e S1P	10
Figura 08 – Destinos de S1P	11
Figura 09 - Participação dos esfingolipídios complexos e intermediários nos procesos relacionados à proliferação celular.	12

Capítulo II - Desafio com fumonisina B1 + B2 promove alteração na expressão de mRNA de IGF-1 e GHR no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo

Figura 01 - Efeito dos níveis de fumonisina e período de alimentação sobre o ganho em peso de alevinos de tilápia-do-Nilo	32
Figura 02 - Eficiência alimentar de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com níveis crescentes de fumonisina aos 15 e 30 dias de tratamento	33
Figura 03 - Efeitos do tempo de consumo e dos níveis de inclusão de fumonisina sobre a expressão gênica de IGF-1 e GHR no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA).....	34

Capítulo III - Expressão gênica de IGF-1 e GHR em tilápias-do-Nilo de diferentes idades desafiadas com fumonisina B1 + B2

Figura 01 - Valores de mRNA de GHR e IGF-1 expressos em unidades arbitrárias (UA) para alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo desafiados com fumonisina 52

Capítulo IV - Ação das fumonisinas B1 + B2 sobre a expressão de genes relacionados ao equilíbrio apoptótico em alevinos de tilápia-do-Nilo

Figura 01 - Efeitos do tempo de consumo e dos níveis de inclusão de fumonisina sobre a expressão gênica de SPL 68

Figura 02 - Efeitos do tempo de consumo e dos níveis de inclusão de fumonisina sobre a expressão gênica de CASP 7..... 68

Figura 03 - Comparação entre o padrão de expressão de mRNA de SPL e CASP 7 aos 15 e 30 dias de tratamento 69

Figura 04 - Relação numérica entre os valores de mRNA de SPL e CASP 7 para os quatro tratamentos aos 15 e 30 dias 69

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - Revisão de literatura

Capítulo I - Revisão de literatura

Tabela 01 - Trabalhos demonstrando o papel anti apoptótico de fumonisina 10

Capítulo II - Desafio com fumonisina B1 + B2 promove alteração na expressão de mRNA de IGF-1 e GHR no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo

Tabela 01 - Composição percentual e química das dietas experimentais 29

Tabela 02 - Sequência dos *primers* usados para as reações de PCR em tempo real 31

Capítulo III - Expressão gênica de IGF-1 e GHR em tilápias-do-Nilo de diferentes idades desafiadas com fumonisina B1 + B2

Tabela 01 - Composição percentual e química das dietas experimentais 48

Tabela 02 - Sequência dos *primers* usados para as reações de PCR em tempo real 50

Tabela 03 - Desempenho de tilápias-do-Nilo desafiadas com dietas contendo fumonisina 51

Capítulo IV - Ação das fumonisinas B1 + B2 sobre a expressão de genes relacionados ao equilíbrio apoptótico em alevinos de tilápia-do-Nilo

Tabela 01 - Composição percentual e química das dietas experimentais 64

Tabela 02 - Sequência dos *primers* usados para as reações de PCR em tempo real 66

Tabela 03 - Expressão gênica relativa dos genes CASP 7 e SPL aos 15 e 30 dias de consumo de níveis crescentes de fumonisina 67

RESUMO

As fumonisinas (FB) são micotoxinas produzidas durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium Proliferatum* e podem causar diversas injúrias, além de perdas em desempenho nos animais que as consomem. Neste estudo, a hipótese de que a ingestão de dietas contendo fumonisina afeta o desempenho produtivo e o equilíbrio apoptótico foi avaliada. Foram realizados dois ensaios, sendo que no primeiro, alevinos de tilápia-do-Nilo ($2,64 \pm 0,06\text{g}$) alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fumonisina (0 mg/kg – dieta controle, 20mg/kg, 40mg/kg e 60mg/kg) foram avaliados quanto ao consumo médio de ração (CRM), o ganho em peso médio (GPM), a eficiência alimentar (EA) e a expressão dos genes que codificam o receptor do hormônio do crescimento (GHR), o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), caspase 7 (CASP 7) e esfingosina fosfato liase (SPL) em tecido hepático. Todas as variáveis foram avaliadas aos 15 e 30 dias de tratamento. As dietas contendo 20, 40 e 60 mg FB/kg de ração reduziram significativamente o GP ($p < 0,0001$), a EA ($p < 0,0001$) e a expressão de mRNA de GHR e IGF1 tanto aos 15 quanto aos 30 dias de tratamento. Houve redução dos níveis relativos de mRNA de SPL para tilápias tratadas com 60mg FB/kg de ração aos 15 dias ($P < 0,0001$) e aumento significativo de SPL para os dois maiores níveis de inclusão aos 30 dias ($P < 0,0001$). A expressão gênica para CASP 7 foi significativamente reduzida aos 15 ($P < 0,0001$) e 30 dias ($P = 0,0011$). No segundo ensaio, alevinos ($2,63 \pm 0,39\text{g}$) e juvenis ($75,9 \pm 11\text{g}$) de tilápia-do-Nilo receberam dietas com e sem a inclusão de fumonisinas (50 mg FB/kg de ração) durante 20 dias, afim de avaliar seus efeitos sobre GPM, CRM, conversão alimentar aparente (CAA) e expressão de mRNA de GHR e IGF-1 no fígado. As dietas contendo FB reduziram significativamente o GPM ($p < 0,0001$) e piorou a CAA ($p < 0,0001$) para alevinos, porém não afetou o CR. Para juvenis, a inclusão de fumonisina não afetou o CMR, CAA e GPM. A expressão de mRNA de GHR e IGF-1 tanto para alevinos quanto para adultos foi significativamente reduzida pela inclusão de fumonisinas nas dietas ($p < 0,0001$). Estes resultados indicam que fumonisinas afetam a expressão hepática de GHR, IGF-1, CASP 7 e SPL, e que seus efeitos sobre o desempenho de tilápias-do-Nilo são dose e tempo dependentes.

Palavras chave: crescimento corporal, apoptose, expressão gênica, metabolismo, fumonisinas.

ABSTRACT

Fumonisin is a mycotoxin produced during the secondary metabolism of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* and may cause several injuries and loss in performance in animals that consume them. In this study, the hypothesis that dietary intake of fumonisin affects the growth performance and the apoptotic balance was tested. Two experiments were performed. In the first, fingerlings of Nile tilapia ($2.64 \pm 0.06\text{g}$) were fed diets containing different levels of fumonisin (0 mg/kg - control diet, 20 mg/kg, 40 mg/kg and 60 mg/kg) and were evaluated at an average feed intake (FI), weight gain (WG), feed efficiency (FE) and the gene expression of growth hormone receptor (GHR), insulin like growth factor 1(IGF-1), caspase7 (CASP 7) and sphingosine phosphate lyase (SPL) in hepatic tissue. All variables were evaluated at 15 and 30 days of treatment. Diets containing 20, 40 and FB 60 mg/kg diet significantly reduced the GP ($p < 0.0001$), FE ($p < 0.0001$), and the mRNA expression of GHR and IGF-1 both at 15 and 30 days of treatment. A reduction of the relative levels of SPL mRNA was observed for tilapias treated with FB 60mg/kg feed for 15 days ($P < 0.0001$) and a significant increase of SPL mRNA was observed after 30 days ($P < 0.0001$). Gene expression for CASP 7 was significantly reduced at 15 ($P < 0.0001$) and 30 days ($P = 0.0011$). In the second experiment, fingerlings ($2.63 \pm 0.39\text{g}$) and juveniles ($75.9 \pm 11\text{g}$) of Nile tilapia were fed diets, with and without the inclusion of fumonisin (FB 50 mg/kg diet) for 20 days in order to evaluate its effects on GPM, CRM, feed conversion (FC) and GHR mRNA expression and IGF-1 in the liver. The diet containing FB reduced the WG ($p < 0.0001$) and worsened FC ($p < 0.0001$) to fingerlings, but it does not affect the FI. For juveniles, the inclusion of fumonisin did not affect the FI, FC and BW. The mRNA expression of GHR and IGF-1 for fingerlings and for juveniles were significantly reduced by the inclusion of fumonisin ($p < 0.0001$). These results indicate that the fumonisin affects the hepatic expression GHR, IGF-1, SPL and CASP 7, and that its effects on the performance of the Nile tilapia are dependent on dosage and time.

Key words: Body growth, apoptosis, gene expression, metabolism, fumonisins.

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA

INTRODUÇÃO

1. Contaminação do milho por micotoxinas

Nos últimos anos, tem-se buscado investigar a qualidade sanitária de grãos destinados a 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). O milho (*Zea mays*) possui grande participação na alimentação animal como matéria-prima básica na formulação de diversas rações, e a qualidade destes grãos depende de diversos fatores. A alta pluviosidade no período de colheita dos grãos, associada à qualidade nutricional do milho, por exemplo, gera ambiente favorável à contaminação por fungos, resultando na produção de micotoxinas.



Figura 1. Milho contaminado com fungo da espécie *Fusarium proliferatum*. (Fonte: Griessler & Encarnação, 2009)

As micotoxinas são produzidas durante o metabolismo secundário de fungos filamentosos (Turner et al., 1999). Algumas destas não produzem sinais clínicos

aparentes nos animais que as consomem, entretanto, podem causar redução da eficiência de produção e aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas (Lazzari, 1997). Além disso, algumas micotoxinas podem ainda ser transmitidas para produtos de origem animal como leite e carne, podendo prejudicar de forma indireta a saúde humana (Bruerton, 2001).

As micotoxinas mais comumente encontradas nas forragens e grãos destinados à alimentação animal, estão geralmente associadas aos gêneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Aspergillus*, sendo que algumas espécies de fungos podem produzir mais de um tipo de micotoxina (Bruerton, 2001).

Dentre as micotoxinas, aquelas oriundas do gênero *Fusarium* são consideradas importantes contaminantes para algumas espécies de animais, como por exemplo, deoxinevelanol, moniliforminas, toxina T2 (Newman, 2000), com destaque para fumonisinas, que contaminam mundialmente grãos e rações (D'Mello et al., 1999; Cruz, 2010).

As micotoxinas fumonisinas são produzidas por fungos das espécies *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (Turner et al., 1999). A estrutura química destas micotoxinas foram demonstrada pela primeira vez por Bezuidenhout et al. (1988), e atualmente, 28 formas análogas de fumonisinas são conhecidas e agrupadas em quatro grupos, denominados de fumonisinas das séries A, B, C e P (Rheeder et al., 2002). As toxinas da série B são as variantes mais comumente encontradas, e são subdivididas em fumonisinas B1, B2 e B3 (Visconti et al., 1995) (Figura 2), sendo que a FB1 é geralmente encontrada numa proporção de 70% do total de fumonisinas detectadas, seguidas pelas formas B2 e B3 (Rheeder et al., 2002).

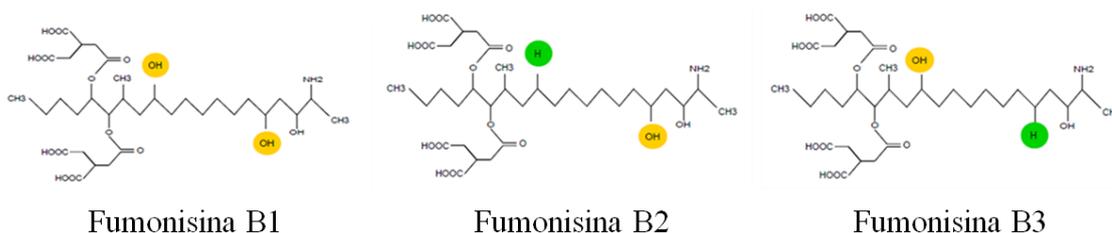


Figura 2. Estrutura química de moléculas de fumonisina B1, B2 e B3. Fonte: Adaptado de Bolger et al. (2001).

As fumonisinas são diésteres de propano-1, 2, 3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12,16-dimetilpoliidroxieicosanos, com o grupo hidroxila no C14 e C15 esterificados

com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbóxico (Soriano & Dragacci, 2004). São altamente polares e com ponto de fusão aproximado de 105 °C (Scussel, 2000), o que torna difícil sua remoção, mesmo quando os alimentos são submetidos a processamento, como a peletização ou extrusão (Bruerton, 2001).

2. Toxicidade das fumonisinas nos animais

A fumonisina pode 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 (Jouany, 2001). A toxicidade das fumonisinas pode afetar órgãos distintos em diferentes espécies, entretanto o fígado e os rins parecem ser afetados de forma constante, sendo hepatotóxica em ratos, camundongos, coelhos, macacos, suínos e equinos, e nefrotóxica em ratos, coelhos, suínos e camundongos (Enongene et al., 2000).

O consumo de elevadas concentrações de fumonisina pode causar leucoencefalomalácia em equinos (Plattner et al., 1990) e síndrome de edema pulmonar e hidrotórax em suínos (Harrison et al., 1990). Em humanos, o consumo de milho contaminado com fumonisinas foi associado a aumento da incidência de câncer esofágico (Alizadeh et al., 2012) e hepático (Ueno et al., 1997).

Um estudo realizado no Brasil com amostras de rações oriundas de fazendas produtoras 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 em peso, piorar a conversão alimentar, além de aumentar a relação esfingalina/esfingosina no fígado.

Em bagres de um e dois anos de idade, o consumo de dietas contaminadas com níveis iguais ou superiores a 20mg FB/kg, provocaram alterações hepáticas como necrose, aumento no volume de hepatócitos e infiltração de linfócitos (LumLertdacha 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, a ingestão de fumonisinas promoveu maior incidência de lesões dermatológicas bacterianas, aumento na contagem de eritrócitos e plaquetas, aumento

nas concentrações de creatinina e bilirrubina e aumento da atividade 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).

3. Mecanismo de ação das fumonisinas: redução de ceramida

Os primeiros relatos do provável mecanismo de ação das fumonisinas foram feitos por Wang et al. (1991). Estes autores demonstraram que estas micotoxinas comprometem parcialmente o metabolismo dos esfingolípídios por meio do bloqueio da síntese de ceramida, que são moléculas de esfingosina ou esfinganina ligadas a um resíduo de ácido graxo (Figura 3).

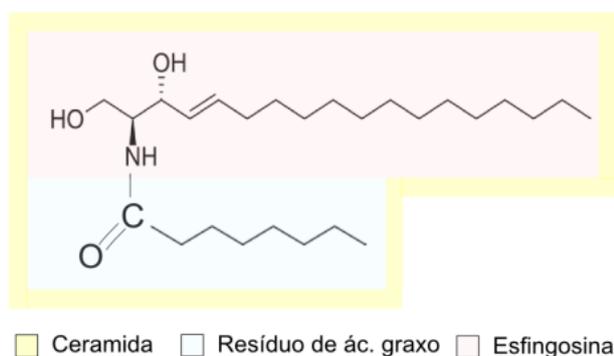


Figura 3. Estrutura da molécula de ceramida.

Em condições normais, a síntese de moléculas de ceramida se dá por dois mecanismos: síntese de novas moléculas e a reciclagem de lipídios que possuem ceramida em sua estrutura. A síntese de novas moléculas, dita “ *síntese de novo*”, ocorre a partir da conversão de esfinganina (Sa) à diidroceramida por uma enzima do retículo endoplasmático, chamada ceramida sintase (CerS). Esta enzima também está envolvida em uma das vias de reciclagem que envolvem a reversão de esfingosina (So) à ceramida. Existem ainda, outras vias de reciclagem, onde a hidrólise de esfingolípídeos complexos geram ceramida, sem a ação da enzima CerS, entretanto, estes processos são menos representativos para as concentrações finais de ceramida, uma vez que qualquer necessidade de novas moléculas depende da ação desta enzima.

As fumonisinas são estruturalmente semelhantes às moléculas de Sa e So (Figura 4).

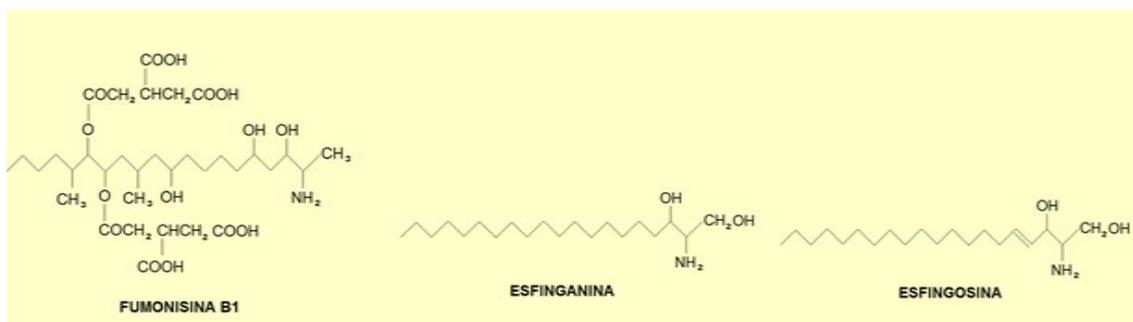


Figura 4. Semelhança estrutural entre fumonisina B1, esfinganina e esfingosina.

Devido a esta 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 à produção de ceramida se acumulam, e as concentrações de ceramida diminuem (Turner et al., 1999). A figura abaixo demonstra uma situação hipotética, com e sem a presença de fumonisina.

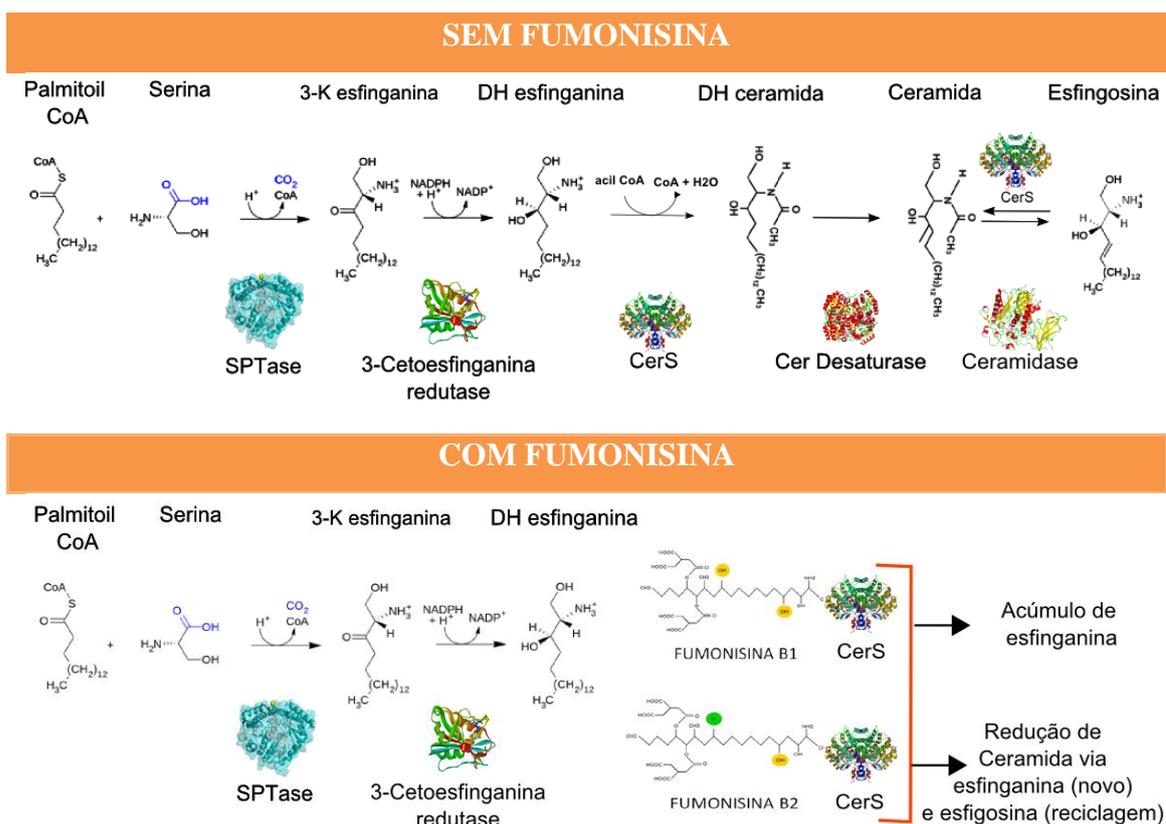


Figura 5. Mecanismos inibição de síntese de ceramida por fumonisinas.

Em condições normais, a condensação de serina com palmitoil-CoA forma 3-cetoesfinganina, que é rapidamente reduzida para dihidroesfinganina e depois convertido para dihidroceramida pela ceramida sintase. Uma dupla ligação é

incorporada ao carbono 4,5 formando ceramida. A molécula de ceramida pode gerar esfingosina, e esta pode ser revertida a ceramida em um processo dependente de ceramida sintase. Na presença de fumonisinas, este mecanismo é interrompido por competição direta da micotoxina pelo sítio de ligação de ceramida sintase.

4. Esfingolipídios

Os primeiros relatos sobre esfingolipídios foram realizados pelo médico alemão Johan Ludwig Wilhelm Thudichum (1829-1901), e publicados no livro “*A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*”. O pesquisador observou que a estrutura química dos novos compostos descobertos pó ele assemelhava-se com os fosfolipídios até então conhecidos, porém não continha como base uma molécula de glicerol, e sim uma nova estrutura, o qual descreveu como tão intrigante quanto uma esfinge, dando-lhe o nome de esfingosina, e ao composto como um todo, esfingolipídio.

Esfingolipídios possuem uma cabeça polar variável unida a molécula de ceramida por ligações glicosídicas ou fosfodiesteres (Figura 6), e são classificados como glicosfingolipídios ou fosfoesfingolipídios dependendo da estrutura da cabeça polar (Shayman, 2000).

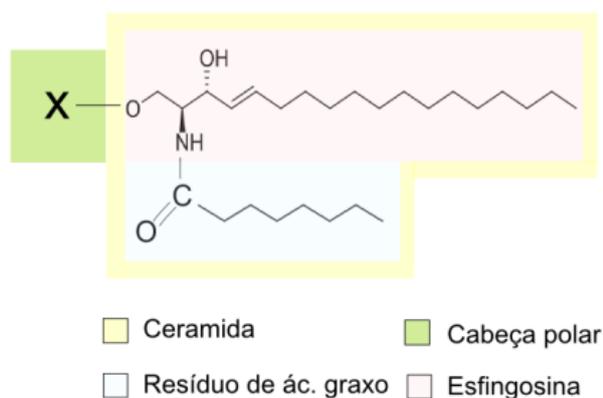


Figura 6. Estrutura da molécula de esfingolipídio.

Os glicosfingolipídeos são moléculas cujas cabeças polares possuem um ou mais resíduos de açúcar conectado à hidroxila (OH) no carbono 1 (C1) da ceramida, e estão amplamente presentes na face externa de membranas plasmáticas. Quando a cabeça polar é formada por um único monossacarídeo (glicose ou galactose), o lipídio é chamado de cerebrosídeo (Shayman, 2000). Esta cabeça polar, entretanto, pode ser

composta por mais de um resíduo de açúcar, chegando a 20 na cadeia oligossacarídica final, sendo classificados como glicosfingolípideos neutros quando esses açúcares são neutros (globosídeo), e glicosfingolípideos ácidos quando um ou mais resíduos de ácido siálico estão presentes (gangliosídeos), ou quando um grupo sulfato está presente (sulfatídeos) (Radin, 1957).

Já os fosfoesfingolípideos possuem um radical fosfato (fosfocolina ou fosfoetanolamina) em sua cabeça polar, e são classificados em esfingomiéline e inositolfosfo-glicosfingolípídios respectivamente. A esfingomiéline é um constituinte importante da bainha de miéline, que envolve os axônios de neurônios, além de estar presente na membrana plasmática das demais células animais (Nelson & Cox, 2011).

Hoje, sabe-se que além do cérebro, os esfingolípídios estão localizados nas membranas celulares de diversas células animais, lipoproteínas e outras estruturas ricas em lipídeos, servem como sítios de ligação para proteínas da matriz extracelular, inclusive para determinados microrganismos e toxinas microbianas (Merril Jr. et al., 2001) e são fundamentais para a manutenção da estrutura lipoprotéica das membranas, e atuam como segundos mensageiros nas vias de sinalização, mediando o crescimento, diferenciação e morte celular (Turner et al., 1999).

5. Apoptose via caspases

A apoptose é a morte celular iniciada por células com danos no DNA, e que não podem ser reparados (Kerr et al., 1972). Sua desregulação está implicada em várias doenças como desordens auto-imunes, neurodegenerativas e cancerosas (Thompson, 1995). Considerada benéfica ao organismo, uma vez que impede a sobrevivência e multiplicação de células danificadas, a apoptose impede a formação de grandes massas celulares, por meio de fragmentação do DNA, condensação da cromatina, compactação de organelas, vesiculação da membrana, redução do tamanho da célula e fracionamento celular (Kerr et al., 1972; Kerr, 2002). Todas estas alterações morfológicas são consequências de uma sucessão de eventos bioquímicos que culminaram na ativação de uma família de enzimas chamadas caspases.

As caspases são proteases que utilizam moléculas de cisteínas como grupo nucleofílico para a clivagem da ligação peptídica após um resíduo específico de ácido aspártico no substrato (Black et al., 1988; Alnemri et al., 1996). São sintetizadas na forma de precursores inativos, e depois convertidas para as formas ativas, por meio de um processo chamado de cascata de caspases (Martin & Green, 1995). Neste processo,

caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) são ativadas por ligantes específicos que regulam diversas proteínas pró e anti-apoptóticas. Uma vez ativadas, as caspases iniciadoras clivam as pré-formas das caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) tornando-as ativas (Lamkanfi et al., 2002; Lamkanfi & Kanneganti, 2010). O início desta cascata se dá por mecanismos relacionados à perturbação mitocondrial ou pela ativação de receptores de morte celular na membrana.

Na via mitocondrial, fatores intracelulares, como danos ao DNA, promovem aumento nas concentrações de ceramida e a ativação da proteína fosfatase 2 (PP2A). Esta fosfatase juntamente com a quinase anti apoptótica Akt / PKB regulam a ação dos fatores anti-apoptóticos da família Bcl-2, promovendo a permeabilidade da mitocôndria. Subsequentemente, a proteína "Smac / DIABLO" e citocromo C são liberadas da mitocôndria para o citoplasma, formando o complexo apoptossomo juntamente com a proteína adaptadora Apaf-1, o que resulta no recrutamento e ativação da caspase iniciadora 9.

Já na via de ativação por receptores de morte celular, estímulos externos à célula se ligam a receptores específicos na membrana, como o fator de necrose tumoral (TNF), por meio de proteínas adaptadoras. Estas proteínas adaptadoras requerem a presença de caspases iniciadoras, principalmente as caspases 8 e 10, tornando-as ativas.

Tanto a via mitocondrial, quanto a via de ativação por meio de receptores de morte, culminam na ativação das caspases efetoras 3 e 7 (Lamkanfi & Kanneganti, 2010), e na conclusão do processo apoptótico.

6. Fumonisin e equilíbrio apoptótico

O desafio de animais com fumonisin promove significativa redução dos níveis de ceramida (Tabela 1), e de proteínas fosfatases (Fukuda et al., 1996). Estes fatores podem afetar a ativação das cascatas de caspases e conseqüentemente, inibir apoptose. Além disso, fumonisin podem elevar os níveis esfinganina/esfingosina 1 fosfato (S1P) (Gelineau-van Waes et al., 2012), uma molécula conhecidamente anti-apoptótica e capaz de estimular a proliferação e sobrevivência celular (Oliveira et al., 2013).

Tabela 1. Trabalhos demonstrando o papel anti apoptótico de fumonisina

Sistema avaliado	Reduziu ceramida	Referências
Células de carcinoma de cabeça e pescoço humano	Sim	Boppana et al., 2014
Células renais do túbulo proximal	N.A	Dahdouh et al., 2014
Células de carcinoma pancreático	Sim	Gong et al., 2014
Células tumorais	Não	Cianchi et al., 2010
Células de carcinoma folicular de tireóide	Sim	Rath et al., 2009
Crietas de rato	N.A	Ch'ang et al., 2005
Astrócitos primários de ratazana	N.A	Mercier et al., 2003
Células endoteliais	Sim	Erdreich-Epstein et al., 2002
Células de carcinoma de próstata	Sim	Sumitomo et al., 2002
Células de carcinoma mamário	Sim	Dbaiibo et al., 2001
Fibroblastos	Sim	Dbaiibo et al., 2001
Células de carcinoma mamário	N.A	Cuvillier et al., 2001
Células endoteliais da aorta de bovino	Sim	Liao et al., 1999
Células leucêmicas	Sim	Laouar et al., 1999
Células endoteliais cerebrais	Sim	Xu et al., 1998
Células da granulosa de galinha	N.A	Witty et al., 1996
Células leucêmicas	Sim	Bose et al., 1995

* N.A – Não avaliado

Huang et al. (2011) propuseram um modelo chamado de reostato de esfingolípídios, 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 à ceramida/esfingosina) ou à sobrevivência e proliferação celular (quando os níveis de S1P são aumentados) (Figura 7).

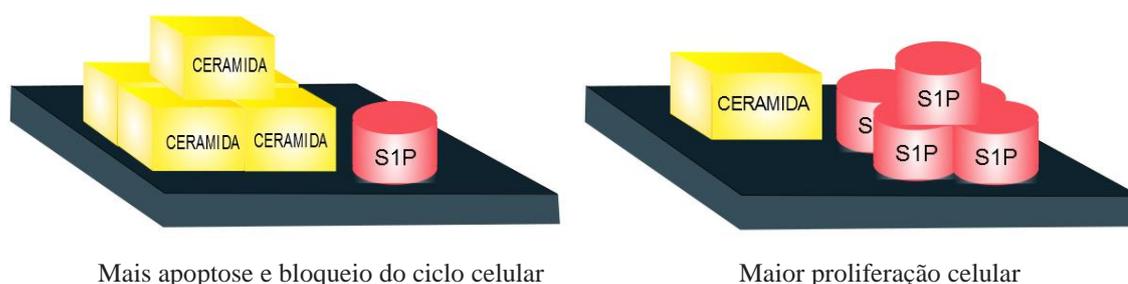


Figura 7. Relação entre ceramida e S1P. Baseado em Huang et al. (2011).

Mobio et al. (2003) sugeriram ainda, que fumonisinas podem induzir uma possível perda de mecanismos de proteção dependente da proteína supressora tumoral p53, o que sinergicamente, com a redução de ceramida e aumento de S1P, poderia contribuir para a toxicidade e ação carcinogênica de fumonisinas, por meio da redução das taxas de apoptose, e proliferação de células danificadas.

As prováveis maneiras para deslocar o reostato de esfingolípídios para uma posição de equilíbrio, onde apoptose e proliferação celular ocorram de maneira adequada, se dão através da ação coordenada das enzimas envolvidas na síntese e degradação de ceramida e S1P. As moléculas de Sa e So estão diretamente envolvidas no metabolismo das ceramidas, e podem ser bioconvertidas para suas formas fosfatadas (S1P) pela enzima Sa/So quinase (SPK). S1P por sua vez pode ser revertido à Sa ou So pela enzima Sa/So fosfato fosfatase (SPP), ou ainda irreversivelmente convertido a hexadecenal e fosfatidiletanolamina pela enzima Sa/So fosfato liase (SPL) (Figura 8).

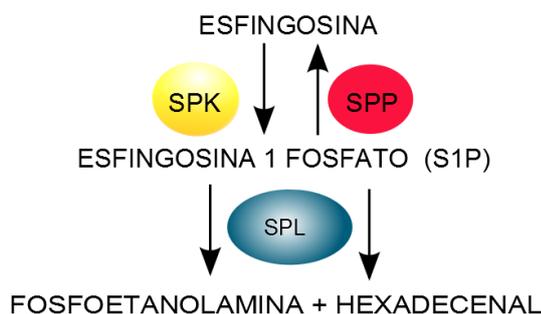


Figura 8. Destinos de S1P.

7. Esfingosina fosfato liase - SPL

A enzima SPL é responsável pela última e irreversível etapa do catabolismo dos esfingolípídios, onde S1P é clivado a hexadecenal e fosfoetanolamina (Ikeda et al., 2004). Falhas da sinalização de S1P, bem como alterações das concentrações de hexadecenal e fosfoetanolamina parecem provocar alterações de SPL, sugerindo que esta enzima exerça efeitos sobre os processos fisiopatológicos por meio de mecanismos que envolvam tanto o substrato quanto os produtos de suas reações (Kumar & Saba, 2009).

A redução na produção de ceramida e o aumento da concentração de S1P estão implicadas no desenvolvimento de resistência à apoptose, entretanto, SPL parece ser capaz de restabelecer o equilíbrio dinâmico entre ceramida e S1P deslocando o equilíbrio em direção a morte celular por meio da atenuação do sinal de S1P (Huwiler & Pfeilschifter, 2006).

Estudos têm apontado SPL como provável alvo terapêutico no combate a doenças relacionadas ao desequilíbrio apoptótico, como esclerose múltipla, lúpus, psoríase,

artrite reumatóide e especialmente no câncer por meio de regulação da expressão gênica (Kumar & Saba, 2009).

8. Esfingolipídios, fumonisina e o crescimento celular

A ligação de fatores de crescimento à receptores da superfície das células iniciam várias cascatas de sinais intracelulares que culminam na síntese de DNA e divisão celular (Ullrich & Schlessinger, 1990). Esfingolipídios, sejam eles complexos ou intermediários, participam ativamente de algumas destas etapas de transdução de sinal, influenciando diretamente as taxas de crescimento celular final (Spiegel & Merrill Jr., 1996) (Figura 9).

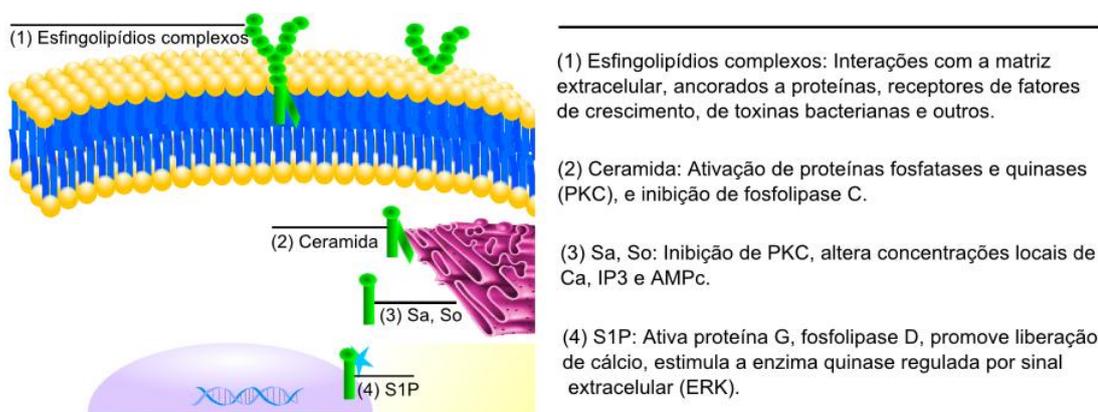


Figura 9. Participação dos esfingolipídios complexos e intermediários nos procesos relacionados a proliferação celular. Adaptado de Spiegel & Merrill Jr., 1996.

Alguns autores demonstraram ainda envolvimento entre esfingolipídios intermediários, como a ceramida e fatores de crescimento corporal (Stewart et al., 1999; Bernacchioni et al., 2012). Os fatores de crescimento, por sua vez, são sinais capazes de estimular a proliferação através da regulação do ciclo celular resultando no controle de diversas características de crescimento corporal (Nelson & Cox, 2011). O fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), por exemplo, liga-se a um receptor, do tipo tirosina-quinase que transduz o sinal para o núcleo por meio de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Ullrich et al., 1986). Ativação de MAPK também é observada após a ligação do hormônio do crescimento (GH) ao seu receptor (GHR), desencadeando resposta na expressão gênica (Nelson & Cox, 2011).

As MAPKs são quinases específicas para os aminoácidos serina, treonina e tirosina, e estão intimamente envolvidas no direcionamento de respostas celulares,

incluindo a proliferação, expressão gênica, a diferenciação, a mitose, a sobrevivência de células, e a apoptose.

Algumas MAPKs são diretamente reguladas por esfingolipídios intermediários, como S1P, por meio de mecanismo acoplado a proteína G (Che et al., 2012). De maneira semelhante a S1P, fumonisinas também são capazes de ativar MAPK (Wattenberg et al., 1996), sugerindo um possível mecanismo de ação indireta sobre a resposta de genes relacionados ao crescimento corporal, como IGF-1, GH e o seu receptor.

Outro segundo mensageiro que pode ser duplamente regulado, tanto por esfingolipídios intermediários, quanto por fatores de crescimento, é a proteína quinase C (PKC). As PKCs são enzimas que fosforilam resíduos de serina e de treonina em proteínas alvo, desempenhando um papel fundamental na mediação de respostas celulares envolvidas na proliferação, diferenciação e apoptose (Maioli et al., 2006).

As moléculas de esfinganina e S1P afetam diretamente a atividade de PKC através da redistribuição celular da atividade enzimática, reduzindo PKC ativada no citoplasma e aumentando PKC ativada na membrana plasmática (Gopee & Sharma, 2003; 2004; Coward et al., 2009). Esta mesma habilidade de redistribuição de PKC ativada também é observada para as fumonisinas, o que pode reduzir a abundância de GHR na membrana como demonstrado por Rui et al. (2000).

De modo geral, a interconexão entre sistemas de sinalização de segundos mensageiros é muito comum, apesar de complexa. Estudos demonstraram que a intoxicação por fumonisinas pode reduzir o ganho em peso em aves, suínos e peixes (Ledoux et al., 1992; Weibking et al., 1993; LumLertdacha et al., 1995; Lazzari, 1997), sendo provável que estas perdas em desempenho estejam relacionadas com mudanças nos padrões de sinalização, e conseqüentemente, de expressão dos genes relacionados ao ganho em peso.

Os principais hormônios do eixo somatotrófico, hormônio do crescimento (GH), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e IGF-1I), além das proteínas transportadoras e receptores, atuam diretamente no controle do metabolismo (Renaville et al., 2002). O GH estimula o crescimento tecidual e seus mecanismos de ação podem ser divididos em diretos, pelo reconhecimento e ligação a GHR na superfície da célula-alvo, e indiretos, pela regulação da síntese dos IGFs (Cruzat et al., 2008).

9. Receptor do hormônio do crescimento (GHR)

O GHR é uma glicoproteína transmembrana de cadeia única com 620 aminoácidos, pertencente à família dos receptores das citocinas/hematopoetinas e é expresso nas mais diversas células (Barton et al., 1989). O GHR é composto por três porções: uma porção extracelular constituída por 246 aminoácidos que se liga e é dimerizada por uma única molécula de GH, contém cinco sítios potenciais de “glicosilação” e sete resíduos-cisteína que permitem o estabelecimento de três pontes dissulfeto dentro da cadeia, formando pequenas alças de 10-15 aminoácidos, um segmento transmembrânico curto e uma porção intracelular de 350 aminoácidos que é necessária para a transmissão dos eventos intracelulares de sinalização estimulados pelo GH (Colosi et al., 1993).

Quando o GH se liga ao GHR, ocorre uma dimerização de GHR, permitindo que a *Janus quinase* (JAK), uma tirosina quinase, se ligue ao domínio interno de GHR e fosforile-o (Han et al., 1996). Uma vez com resíduos de tirosina fosforilados, GHR pode formar complexos com as proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição (STAT) aproximando-as de JAK, favorecendo a fosforilação de STAT por JAK. Quando duas moléculas de STAT fosforiladas se dimerizam, expõem uma sequência de localização nuclear (NLS) que direciona o dímero ao núcleo da célula. No núcleo, STAT estimula a expressão gênica. Paralelamente, JAK fosforilada pode ainda ativar as cascatas de MAPK, e estimular adicionalmente a expressão gênica (Nelson & Cox, 2011).

A capacidade de resposta ao GH nas células-alvo é principalmente dependente da expressão de GHR (Talamantes & Ortiz, 2002), que se mostra aumentada nos indivíduos que apresentam maior desenvolvimento muscular (Scanes et al., 1975). A expressão do GHR pode ainda modular a síntese de IGF, por meio da ação de GH.

10. Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)

Os IGFs modulam o crescimento de forma autócrina, parácrina ou endócrina e participam da retroalimentação do hormônio de crescimento (GH) pelo eixo hipotálamo-hipófise (Guyton & Hall, 2006). Os IGFs promovem o crescimento dos músculos, cartilagens e ossos através da diferenciação celular de condroblastos, fibroblastos e mioblastos (Isaksson et al., 1985). Atuam na captação de glicose e aminoácidos para as células, estimulam a síntese e reduzem a degradação de proteínas. (Gomes & Tirapegui, 1998).

O IGF-1 é considerado como possível agente na prevenção da perda da função muscular associada ao envelhecimento (Musaro et al., 2001), uma vez que possibilita a hipertrofia muscular através do aumento da síntese protéica (Lee et al., 2004). Além disso, está correlacionado positivamente à taxa de ganho em peso vivo, podendo exercer papel importante na fisiologia do crescimento (Stick et al., 1998; Scanes, 2009).

11. Hipótese geral da tese

Com base na semelhança estrutural existente entre as fumonisinas, esfingosina e esfinganina, é provável que ocorram mudanças nas concentrações finais de ceramida o que pode afetar diretamente a expressão gênica da caspase efetora 7, uma vez que esta é intrinsecamente ativada por ceramida. Com o bloqueio de CerS, é provável que o excesso de bases esfingoides (esfinganina + esfingosina) formado, gere maiores concentrações de S1P e alterem a expressão da enzima SPL, responsável pela bioconversão irreversível de S1P. Tanto ceramida quanto S1P e fumonisinas estão diretamente relacionados com a modulação de MAPK e PKC, o que pode resultar em alterações nas vias de transdução de sinal que as envolvem, como as respostas de IGF-1 e GH via GHR. Sinergicamente, estes fatores podem culminar em prejuízos produtivos e sanitários para os animais, dependendo da concentração e tempo de exposição à fumonisina.

Referências

- Alizadeh, A.M.; Rohandel, G.; Roudbarmohammadi, S.; Roudbary, M.; Sohanaki, H.; Ghiasian, S.A.; Taherkhani, A.; Semnani, S.; Aghasi, M. Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in a high risk area in northeastern Iran. **Asian Pac J Cancer Prev.** v.13(6):2625-8, 2012.
- Alnemri, E.S.; Livingston, D.J.; Nicholson, D.W.; Salvesen, G.; Thornberry, N.A.; Wong, W.W.; Yuan, J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. **Cell.** Oct v.18;87(2):171, 1996.
- 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.5:3, 2013.
- Barton, D.E.; Foellmer, B.E.; Wood, W.I.; Francke, U. Chromosome mapping of the growth hormone receptor gene in man and mouse. **Cytogenetics and Cell Genetics.** v.50 137–141. 1989
- Bernacchioni, C.; Cencetti, F.; Blescia, S.; Donati, C.; Bruni, P. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate axis: a new player for insulin-like growth factor-1- induced myoblast differentiation. **Skeletal Muscle,** v.2:15. 10.1186/2044-5040-2-15, 2012.
- Bezuidenhout, G.C.; Gelderblom, W.C.A.; Gorst-Allman, C.P.; Horak, R.M.; Marasas, W.F.O.; Spiteller, G. e Vleggaar, R. F. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.,** v.11, 743-745, 1988.
- Black, R.A.; Kronheim, S.R.; Cantrell, M.; Deeley, M.C.; March, C.J.; Prickett, K.S.; Wignall, J.; Conlon, P.J.; Cosman, D.; Hopp, T.P. et al. Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. **J Biol Chem.** 1988 Jul 5;263(19):9437–9442.
- Bolger, M.; Coker, R. D.; Dinovi, M.; Gaylor, D.; Geldeblom, W.; Olsen, M.; Paster, N.; Riley, R. T.; Shephard, G. and Spijers, G. J. A. Fumonisin. Safety evaluation of certain mycotoxin in food. International Programme on Chemical Safety World Health Organization. Geneva. **FAO FOOD and Nutrition Paper** 74, WHO - Food Additives Series, v.47, 103-279, 2001.
- Boppana, N.B.; Kодиha, M.; Stochaj, U.; Lin, H.S.; Haimovitz-Friedman, A.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Divine, G.W.; Boyd, J.A.; Korbelik, M.; Separovic, D. Ceramide synthase inhibitor fumonisin B1 inhibits apoptotic cell death in SCC17B human head and neck squamous carcinoma cells after Pc4 photosensitization. **Photochem Photobiol Sci.** v.15;13(11):1621-7, 2014.
- Bose, R.; Verheij, M.; Haimovitz-Friedman, A.; Scotto, K.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. **Cell.** v.82:405-414, 1995.
- Bruerton, K. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. In: **Alltech's 17th Annual Symposium,** Proceedings. p. 161-168. 2001.
- 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, 29–36, 2001.
- Ch'ang, H.J.; Maj, J.G.; Paris, F.; Xing, H.R.; Zhang, J.; Truman, J.P.; Cardon-Cardo, C.; Haimovitz-Friedman, A.; Kolesnick, R.; Fuks, Z. ATM regulates target

- switching to escalating doses of radiation in the intestines. **Nat Med.** 11(5):484-90, May 2005.
- Che, W.; Manetsch, M.; Quante, T.; Rahman, M.M.; Patel, B.S.; Ge, Q.; Ammit, A.J. Sphingosine 1-phosphate induces MKP-1 expression via p38 MAPK- and CREB-mediated pathways in airway smooth muscle cells. **Biochim Biophys Acta.** Oct; v.1823(10):1658-65, 2012.
- Cianchi, F.; Vinci, M.C.; Supuran, C.T.; Peruzzi, B.; De Giuli, P.; Fasolis, G.; Perigli, G.; Pastorekova, S.; Papucci, L.; Pini, A.; Masini, E.; Puccetti, L. Selective inhibition of carbonic anhydrase IX decreases cell proliferation and induces ceramide-mediated apoptosis in human cancer cells. **J Pharmacol Exp Ther.** Sep 1; v.334(3):710-9, 2010.
- Colosi, P.; Wong, K.; Leong, S.R.; Wood, W.I. Mutational analysis of the intracellular domain of the human growth hormone receptor. **J Biol Chem.** Jun 15; v.268(17):12617-23, 1993.
- Coward, J.; Ambrosini, G.; Musi, E.; Truman, J.P.; Haimovitz-Friedman, A.; Allegood, J.C.; Wang, E.; Merrill Jr, A.H.; Schwartz, G.K. Safingol (L-threo-sphinganine) induces autophagy in solid tumor cells through inhibition of PKC and the PI3-kinase pathway. **Autophagy.** v. 5(2):184-93, 2009.
- Cruz, J.V.S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo.** Tese de Doutorado. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2010.
- Cruzat, V.F.; Donato Júnior, J.; Tirapegui, J.; Schneider, C.D. Hormônio do crescimento e exercício físico: considerações atuais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 44, n. 4, out./dez., 2008.
- Cuvillier, O.; Nava, V.E.; Murthy, S.K.; Edsall, L.C.; Levade, T.; Milstien, S.; Spiegel, S. Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells. **Cell Death Differ.** v.8:162-171, 2001.
- Dahdouh, F.; Raane, M.; Thévenod, F.; Lee, W.K. Nickel-induced cell death and survival pathways in cultured renal proximal tubule cells: roles of reactive oxygen species, ceramide and ABCB1. **Arch Toxicol.** Apr; v.88(4):881-92, 2014.
- Dbaiibo, G.S.; El-Assaad, W.; Krikorian, A.; Liu, B.; Diab, K.; Idriss, N.Z.; El-Sabban, M.; Driscoll, T.A.; Perry, D.K.; Hannun, Y.A. Ceramide generation by two distinct pathways in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. **FEBS Lett.** Aug 10; v.503(1):7-12, 2001.
- D'Mello, J.P.F.; Placinta, C.M.; Macdonald, A.M.C. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science And Technology,** Amsterdam, v.80, p.183-205, 1999.
- Enongene, E.N.; Sharma, R.P.; Bhandari, N.; Voss, K.A.; Riley, R.T. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B1. **Food and Chemical Toxicology,** Oxford, v.38, p.793-799, 2000.
- Erdreich-Epstein, A.; Tran, L.B.; Bowman, N.N.; Wang, H.; Cabot, M.C.; Durden, D.L.; Vlckova, J.; Reynolds, C.P.; Stins, M.F.; Groshen, S.; Millard, M. Ceramide signaling in fenretinide-induced endothelial cell apoptosis. **J Biol Chem.** Dec 20; v.277(51):49531-7, 2002.

- Fukuda, H.; Shima, H.; Vesonder, R.F.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Katoh, S.; Tamura, S.; Sugimura, T.; Nagao, M. Inhibition of protein serine/threonine phosphatases by fumonisin B1, a mycotoxin. **Miochem Biophys Res Commun.** Mar 7; v.220(1):160-5, 1996.
- Gelineau-van Waes, J.; Rainey, M.A.; Maddox, J.R.; Voss, K.A.; Sachs, A.J.; Gardner, N.M.; Wilberding, J.D.; Riley, R.T. Increased sphingoid base-1-phosphates and failure of neural tube closure after exposure to fumonisin or FTY720. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v.94: 790-803, 2012.
- Gomes, M.R.; Tirapegui, J. Relação entre o fator de crescimento semelhante a insulina(IGF-1) e atividade física. **Rev. bras. ativ. fis. saúde.** v.3, n.4, p.66-76, abr, 1998.
- Gong, L.; Yang, B.; Xu, M.; Cheng, B.; Tang, X.; Zheng, P.; Jing, Y.; Wu, G.J. Bortezomib-induced apoptosis in cultured pancreatic cancer cells is associated with ceramide production. **Cancer Chemother Pharmacol.** Jan; v.73(1):69-77, 2014.
- Gopee, N.V.; Sharma, R.P. Selective and transient activation of protein kinase C alpha by fumonisin B1, a ceramide synthase inhibitor mycotoxin, in cultured porcine renal cells. **Life Sci.** Feb 6; v.74(12):1541-59, 2004.
- Gopee, N.V.; Sharma, R.P. Sphingoid bases and their phosphates: transient activation and delayed repression of protein kinase C isoforms and their possible involvement in fumonisin B1 cytotoxicity. **Toxicology.** May 3; v.187(2-3):239-50, 2003.
- Griessler, K.; Encarnação, P. Fumonisinins - mycotoxins of increasing importance in fish. **Aquacult Asia Magazine**, XIV (2): 24-26, 2009.
- Guyton, A.C.; Hall, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.
- Han, Y., Leaman, D.W.; Watling, D.; Rogers, N.C.; Groner, B.; Kerr, I.M.; Wood, W.I.; and Stark, G.R. Participation of JAK and STAT proteins in growth hormone-induced signaling. **J Biol Chem**, v.271, 5947-5952. 1996.
- Harrison, L.R.; Colvin, B.M.; Greene, J.T.; Newman, L.E.; Cole, J.R. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **J.Vet. Diagn. Invest.**, 2, v.217-221, 1990.
- Huang, Y.L.; Huang, W.P.; Lee, H. Roles of sphingosine 1-phosphate on tumorigenesis. **World J Biol Chem.** 26; v.2(2): 25-34, 2011.
- Huwiler, A.; Pfeilschifter, J. Altering the sphingosine-1-phosphate/ceramide balance: a promising approach for tumor therapy. **Curr Pharm Des.** v.12(35):4625-35, 2006.
- Ikeda, M.; Kihara, A.; Igarashi, Y. Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. **Biochem Biophys Res Commun.** Dec 3; v.325(1):338-43, 2004.
- Isaksson, O.G.; Eden, S.; Jansson, J.O. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. **Annu Rev Physiol** 47:483-499, 1985.
- 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.
- Jouany, J.P. The impact of mycotoxins on performance and health of dairy cattle. In: Alltech's 17th Annual Symposium, 2001. **Proceedings...** p.191-222, 2001.

- Kerr, J.F.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. 1972;26:239–57.
- Kerr, J.F. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**. 2002;181–182:471–4.
- Kovačić, S.; Pepeljnjak, S.; Petrincec, Z.; Klarić, M.S. Fumonisin B1 neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio l.*). **Arh Hig Rada Toksikol**; v.60:419-426, 2009.
- Kumar, A.; Saba, J.D. Lyase to live by: sphingosine phosphate lyase as a therapeutic target. **Expert Opin Ther Targets**. v.13(8):1013-25, 2009.
- Lamkanfi, M.; Declercq, W.; Kalai, M.; Saelens, X.; Vandenabeele, P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. **Cell Death Differ**; v.9:358–61, 2002.
- Lamkanfi, M.; Kanneganti, T.D. Caspase-7: a **protease involved in apoptosis and inflammation**. **Int J Biochem Cell Biol**. v.42(1):21-4, 2010.
- Laouar, A.; Glesne, D.; Huberman, E. Involvement of protein kinase C-beta and ceramide in tumor necrosis factor-alpha-induced but not Fas-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells. **J Biol Chem**. v.13;274(33):23526-34, 1999.
- Lazzari, F.A. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. Curitiba 2^a ed., **Paranaset**. 134p, 1997.
- Ledoux, D.R.; Brown, T.; Weibking, T.S.; Rottinghaus, G.E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **J. Vet.Diagn. Invest**. v.4(3), 330–333, 1992.
- Lee, S.; Barton, E.R.; Sweeney, H.L.; Farrar, R.P. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **J. Appl. Physiol**. v.96, p.1097-1104, 2004.
- Liao, W.C.; Haimovitz-Friedman, A.; Persaud, R.S.; McLoughlin, M.; Ehleiter, D.; Zhang, N.; Gatei, M.; Lavin, M.; Kolesnick, R.; Fuks, Z. Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. **J Biol Chem**. v.18; 274(25):17908-17, 1999.
- Listrat, A.; Hocquette, J.F.; Picard, B.; Ménessier, F.; Djiane, J.; Jammes, H. Growth hormone receptor gene expression in the skeletal muscle of normal and double-muscled bovines during fetal development. **Reprod Nutr Dev**. v.45(4), p.393-403, 2005
- LumLertdacha, S.; Lovell, R.T.; Shelbyb, 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.
- Maioli, E.; Torricelli, C.; Fortino, V. Functional interactions of protein kinase A and C in signalling networks: a recapitulation. **Cell Mol Life Sci**. v.63(6), p.637-41, 2006.
- Martin, S.J.; Green, D.R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?. **Cell**, 82 (1995), pp. 349–352.
- Mercier, C.; Declèves, X.; Masseguin, C.; Fragner, P.; Tardy, M.; Roux, F.; Gabrion, J.; Scherrmann, J.M. P-glycoprotein (ABCB1) but not multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) is induced by doxorubicin in primary cultures of rat astrocytes. **J Neurochem**. v.87(4), p.820-30, 2003.
- Merril Jr., A. H.; Sullards, C.; Wang, E.; Voss, K. A.; Riley, R. T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.2, p.283-289, may 2001.
- Mobio, T.A.; Tavan, E.; Baudrimont, I.; Anane, R.; Carratú, M.R.; Sanni, A.; Gbeassor, M.F.; Shier, T.W.; Narbonne, J.F.; Creppy, E.E. Comparative study of the toxic effects of fumonisin B1 in rat C6 glioma cells and p53-null mouse embryo fibroblasts. **Toxicology**, v. 1;183(1-3), p.65-75, 2003.

- Musaro, A.; Mccullagh, K.; Paul, A.; Houghton, L.; Dobrowolny, G.; Molinaro, M.; Barton, E.R.; Sweeney, H.L.; Rosenthal, N. Localized IGF-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. **Nat. Genet.** v.27, p. 195-200. 2001.
- Nelson, D.I.; Cox, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica.** 5º Ed. São Paulo: SARVIER. 2011
- Newman, K. The biochemistry behind esterified glucomannanstitrating mycotoxins out of the diet. In: Alltech's 16th Annual Symposium, 2000. **Proceedings....** p.369-382, 2000.
- Oliveira, A.; Allende, M.L.; Proia, R.L. Shaping the landscape: Metabolic regulation of S1P gradients. **Biochim Biophys Acta.** v.1831(1), p. 193-202, 2013.
- Pepeljnjak, S.; Petrinc, Z.; Kovacic, S.; Segvic, M. Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio L.*) on feed amended with fumonisin B1. *Mycopathologia* v. 156: 139–145, 2002.
- Plattner, R.D.; Norred, W.P.; Bacon, C.W.; Voss, K.A.; Peterson, R.; Shackelford, D.D.; Weisleder, D. A method of detection of fumonisin in corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. **Mycologia**, v.82, 698–702, 1990.
- Qiagen sample assay technologies. Acesso em 12/02/2015 às 10:50. <https://www.qiagen.com/br/>
- Radin, N.S. Glycolipide chromatography. **Fed Proc.** v.16(3):825-6, 1957.
- Rath, G.; Schneider, C.; Langlois, B.; Sartelet, H.; Morjani, H.; Btaouri, H.E.; Dedieu, S.; Martiny, L. De novo ceramide synthesis is responsible for the anti-tumor properties of camptothecin and oxorubicin in follicular thyroid carcinoma. **Int J Biochem Cell Biol.** v.41(5):1165-72, 2009.
- Renaville, R.; Hammadi, M.; Portetelle, D. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, n.2, p.351-360, 2002.
- Rheeder, J.P.; Marasas, W.F.; Vismer, H.F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. **Appl Environ Microbiol.** v.68(5):2101-5, 2002.
- Rui, L.; Archer, S.F.; Argetsinger, L.S.; Carter-Su, C. Platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid inhibit growth hormone binding and signaling via a protein kinase C-dependent pathway. **J Biol Chem.** v.28;275(4):2885-92, 2000.
- SAS Institute. Sas/Stat software: changes and enhancements, release 6.07. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1992. chapter 16: The MIXED procedure. (SAS. Technical Report P-229). Scanes, C.G.; Telfer, S.B.; Hackett, A.F.; Nightingale, R.; Sharifuddin, B.A. Effects of growth hormone on tissue metabolism in broiler chicks. **Br Poult Sci.** 16(4):405-8. 1975.
- Scanes, C.G. Perspectives o the endocrinology of poultry growth and metabolism. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.163:24-32, 2009.
- Scussel, V.M. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos.** 1.ed. Santa Catarina: Editora Vildes Maria Scussel, 2000. Disponível na Biblioteca da UFAM.
- Shayman, J.A. Sphingolipids. Perspectives In Basic Science. **Kidney International**, v. 58, pp. 11-26, 2000.
- Soriano, J.M.; Dragacci, S. Occurence of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37, p. 985-1000, 2004.
- Spiegel, S.; Merrill, Jr, A.H. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. **FASEB J.**v.10(12):1388-97, 1996.

- Stewart, C.E.; Newcomb, P.V.; Savage, P.B.; Dickens, M.; Tavare, J.; Holly, J.M. Increased, not decreased activation of the insulin-like growth factor (IGF) receptor signalling pathway during ceramide-induced apoptosis. **Growth Horm IGF Res.** v.9(2):131-42, 1999.
- Stick, D.A.; Davis, M.E.; Loerch, S.C.; Simmen, R.C. Relationship between blood serum insulin-like growth factor I concentration and postweaning feed efficiency of crossbred cattle at three levels of dietary intake. **J. Anim. Sci.** v.76: 498-505,1998.
- Sumitomo, M.; Ohba, M.; Asakuma, J.; Asano, T.; Kuroki, T.; Asano, T.; Hayakawa, M. Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation via mitochondrial signaling in prostate cancer cells. **J Clin Invest.** v.109 (6):827-36, 2002.
- Tajika, Y.; Murakami, T.; Sato, M.; Kubota, F.; Yorifuji, H. VAMP2 is expressed in myogenic cells during rat development. **Developmental Dynamics,** v. 237(7):1886 – 1892, 2008.
- Talamantes, F.; Ortiz, R. Structure and regulation of expression of the mouse GH receptor . **Journal of Endocrinology,** v.175, 55–59. 2002.
- Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** v.267:1456-1462, 1995.
- 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. 217 515-528, 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.
- Ueno, Y.; Iijima, K.; Wang, S.D.; Sugiura, Y.; Sekijima, M.; Tanaka, T.; Chen, C. Yu, S.Z. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. **Food Chem Toxicol.** v.35(12):1143-50, 1997.
- Ullrich, A.; Gray, A.; Tam, A.W.; Yang-Feng, T.; Tsubokawa, M.; Collins, C.; Henzel, W.; Le Bon, T.; Kathuria, S.; Chen, E. Insulin like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. **EMBO J.** v.5(10):2503-12, 1986.
- Ullrich, A.; Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell.** v.20:61(2):203-12, 1990.
- Visconti, A.; Boenke, A.; Doko, M. B.; Solfrizzo, M.; Pascale, M. Occurrence of fumonisin in Europe and BCR: measurements and testing projects. **Natural Toxins,** New York, v.3, n.4, p.269-274, 1995.
- 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):14486-90, 1991.
- Wattenberg, E.V.; Badria, F.A.; Shier, W.T. Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic mycotoxin fumonisin B1. **Biochem Biophys Res Commun.** v.14;227(2):622-7, 1996.
- Weibking, T. S.; Ledoux, D. R.; Bermudez, A. J.; Turk, J. R.; Rottinghaus, G. E. Effects of Feeding *Fusarium moniliforme* Culture Material, Containing Known Levels of Fumonisin B1, on the Young Broiler Chick. **Poultry Science,** v.72 (3): 456-466, 1993.
- Witty, J.P.; Bridgham, J.T.; Johnson, A.L. Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide. **Endocrinology,** v.137(12):5269-77, 1996.

Xu, J.; Yeh, C.H.; Chen, S.; He, L.; Sensi, S.L.; Canzoniero, L.M.; Choi, D.W.; Hsu, C.Y. Involvement of de novo ceramide biosynthesis in tumor necrosis factor- α /cycloheximide-induced cerebral endothelial cell death. **J Biol Chem**, v.26; 273(26):16521-6, 1998.

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos foram avaliar os efeitos do desafio com fumonisinas sobre a expressão gênica do receptor do hormônio do crescimento (GHR), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-1), caspase 7 (CASP 7) e esfingosina fosfato liase (SPL) em tecido hepático. As características produtivas de tilápias-do-Nilo em ensaios considerando o nível de inclusão de fumonisinas, o tempo de consumo e a idade dos peixes também foram considerados.

CAPÍTULO II

Desafio com fumonisinas B1 + B2 promove alteração na expressão gênica de IGF-1 e GHR no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo

Desafio com fumonisinas B1 + B2 promove alteração na expressão gênica de IGF-1 e GHR no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo

Resumo - As fumonisinas, produtos do metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, podem causar piora no desempenho dos animais. Apesar das fumonisinas serem apontadas como responsáveis por alterações no ganho em peso, há uma escassez de informações sobre seus efeitos na expressão de genes relacionados ao crescimento, em especial para alevinos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Neste estudo, alevinos de tilápia-do-Nilo foram tratados com níveis crescentes de fumonisina (FB) (0, 20, 40 e 60 mg FB/kg de ração) para avaliar seus efeitos sobre o ganho em peso (GP), consumo de ração (CR), eficiência alimentar (EA) e expressão de mRNA de GHR e IGF-1 no fígado. A dieta contendo 0 mg FB/kg foi utilizada como tratamento controle. Todas as variáveis foram avaliadas aos 15 e 30 dias de tratamento. As dietas contendo 20, 40 e 60 mg FB/kg de ração reduziram significativamente o GP ($p < 0,0001$), a EA ($p < 0,0001$) e a expressão de mRNA de GHR e IGF1, tanto aos 15, quanto aos 30 dias de tratamento. O consumo de ração não foi afetado pelas dietas em nenhum dos períodos avaliados. Estes resultados indicam que a fumonisina afeta o crescimento de alevinos de tilápia-do-Nilo por meio de mecanismos que envolvem a redução na expressão de GHR e IGF-1.

Termos para indexação: expressão gênica, desempenho, *Fusarium*, *Oreochromis niloticus*

Diets containing fumonisin involves alteration of mRNA expression of IGF-1 and GHR in the liver of Nile tilapia fingerlings

Abstract - Fumonisins, secondary metabolic products of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*, may cause losses in performance of the animals. Although fumonisins are identified as possible responsible for changes in weight gain, there is paucity information about its effects on the expression of genes related to growth, particularly for Nile tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*). In this study, fingerlings of Nile tilapia were treated with increasing levels of fumonisin (FB) (0, 20, 40 and 60 mg FB/kg diet) to assess their effects on weight gain (WG), consumer ration (CR) feed efficiency (FE) and mRNA expression of GHR and IGF-1 in the liver. The diet containing 0 mg/kg of FB was used as a control treatment. All variables were evaluated at 15 and 30 days of treatment. Diets containing 20, 40 and FB 60 mg / kg diet reduced the GP ($p < 0.0001$), EA ($p < 0.0001$), and the mRNA expression of GHR and IGF-1 both at 15 and 30 days of treatment. Feed intake was not affected by diets in any of the periods. These results indicate that fumonisin affects the growth of fingerlings of the Nile tilapia through mechanisms that involve a reduction in the expression of GHR and IGF-1.

Index terms: gene expression, performance, mycotoxin, *Oreochromis niloticus*

Introdução

As fumonisinas, produtos do metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, podem causar prejuízo no desempenho dos animais. Wang et al. (1991) demonstraram que os mecanismos de ação das fumonisinas envolve o comprometimento parcial do metabolismo dos esfingolipídios intermediários, esfingosina e esfinganina, por meio de competição pelo sítio de ligação da ceramida sintase, uma enzima chave na reciclagem e na síntese de novas moléculas de ceramida. Com base nesta hipótese, diversos estudos avaliaram os efeitos de fumonisinas em diferentes espécies, idades e com diferentes concentrações da micotoxina, associada ou não a outras micotoxinas, *in vivo* e *in vitro*, comprovando desta forma, sua citotoxicidade (Riley et al., 2001; Domijan et al., 2011; Chuturgoon et al., 2014).

O desequilíbrio entre as bases esfingóides foi apontado como responsável por produzir efeito secundário de fumonisinas sobre diversos processos celulares, como diferenciação e crescimento celular, apoptose, estresse oxidativo (Domijan & Abramov, 2011) e hipometilação de DNA (Chuturgoon et al., 2014). Na produção animal, diversas injúrias são associadas ao consumo de dietas contaminadas com fumonisinas, além de redução da eficiência alimentar e menores taxas de ganho em peso (Riley et al., 2001).

A toxicidade das fumonisinas foi avaliada para diferentes espécies de peixes. Em bagres de aproximadamente 1,2 e 31g, o consumo de dietas contaminadas com 20, 80, 320, ou 720mg FB/kg de ração promoveu alterações hepáticas como aumento no volume de hepatócitos, infiltração de linfócitos, e hepatócitos necróticos (LumLertdacha et al., 1995). Em trutas, a aflatoxina B1 teve seu efeito carcinogênico hepático potencializado pela associação com a fumonisina B1 (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 da atividade das enzimas aspartato e alanina aminotransferase (Pepeljnjak et al., 2002). Outro estudo realizado em carpas atribuiu às fumonisinas um efeito neurotóxico, por meio de vacuolização, degeneração e necrose de neurônios (Kovačić et al., 2009). Para tilápias, Tuan et al. (2003) observaram que níveis superiores a 40 mg FB/kg de ração pode reduzir o ganho em peso, piorar a conversão alimentar, além de afetar diretamente o equilíbrio dos esfingolipídios intermediários.

Esfingolipídios são extremamente importantes para o crescimento, uma vez que atuam como precursores de segundos mensageiros, modulando as respostas celulares a

fatores de crescimento (Olivera & Spiegel, 1993; Merrill Jr. et al., 2001), que por sua vez, unem-se a seus receptores na membrana celular ativando uma cascata de sinais, promovendo, desta forma, a ativação de um ou vários genes (Krauss, 2008).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são fatores envolvidos no processo de crescimento corporal, que atuam por meio de mecanismos de retroalimentação relacionados ao hormônio do crescimento (GH) e ao seu receptor (GHR). Desta forma, é possível que a desruptura dos esfingolipídios causada por fumonisinas leve a alterações na sinalização de IGF-1 promovendo assim, alterações na expressão de genes do eixo somatotrópico, e consecutivamente, no crescimento dos animais. Entretanto, na literatura não se encontrou relatos de associação entre a expressão dos genes GHR e IGF-1 e alterações no metabolismo de esfingolipídeos causados pelo consumo de rações contaminadas com fumonisina.

Com este estudo, objetivamos testar a hipótese de que dietas contendo fumonisinas podem alterar a expressão de genes GHR e IGF-1, reduzindo o crescimento de alevinos de tilápia-do-Nilo e causando prejuízos econômicos. Desta forma, foi realizado um ensaio mantendo alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de fumonisinas B1 + B2 e avaliados o ganho em peso, o consumo de ração, a eficiência alimentar e a expressão dos genes GHR e IGF-1 em tecido hepático, aos 15 e 30 dias de tratamento.

Material e métodos

Os procedimentos neste experimento foram realizados de acordo com regulamento da comissão de ética no uso de animais (CEUA - UniCesumar).

Delineamento Experimental e Animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá - UEM, durante o mês de outubro de 2014. Foram utilizados 180 alevinos de tilápia-do-Nilo, revertidos sexualmente para macho, pertencentes ao grupo genético GIFT x Tailandesa, com peso inicial de $2,64 \pm 0,06$ g. Foram utilizadas 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 acopladas quatro hapas totalizando 12 unidades experimentais com quatro tratamentos e três repetições. Cada hapa possuía um volume individual de 217,50L onde foram alojados 15 peixes, totalizando 14,5 L/peixe.

Os peixes passaram por um período de adaptação de 15 dias, antes do início do experimento.

Variáveis físicas e químicas da água

A temperatura foi aferida duas vezes ao dia em cada tanque, às 9:00 e 17:00 horas, já o oxigênio dissolvido e o pH foram aferidos pela manhã durante todo o período experimental, por meio de kit individual colorimétrico.

Dietas experimentais

As fumonisinas B1 + B2 foram adquiridas em forma de meio de cultura, por intermédio do laboratório de análises micotoxicológicas – LAMIC, da Universidade Federal de Santa Maria - UFMS. As dietas foram elaboradas considerando a concentração de FB1 + FB2 indicadas em laudo fornecido pelo LAMIC, totalizando uma concentração de 7,41mg de fumonisina/g de meio de cultura (6,06mg de FB1 + 1,35mg FB2/g de meio).

Foram elaboradas quatro dietas isocalóricas (aproximadamente 3000 kcal de energia digestível ED/kg de dieta) e isotróficas (aproximadamente 33% de proteína bruta), variando apenas quanto à inclusão de diferentes níveis de fumonisina, divididos nos seguintes grupos: 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 FB/kg e GRUPO 4 - 60 mg de inclusão de FB/kg (Tabela 1).

As dietas foram peletizadas, secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 48 horas, desintegradas em moedor manual e as partículas classificadas de acordo com a granulometria (1 a 2mm). Após prontas, as dietas foram novamente avaliadas para a confirmação dos níveis de fumonisinas adicionados. A composição química das dietas foi avaliada de acordo com protocolos descritos por Silva & Queiroz, 2006.

As dietas foram fornecidas manualmente aos peixes, três vezes/dia, até saciedade aparente dos peixes.

Tabela 1- Composição percentual e química das dietas experimentais

<i>Ingredientes (%)</i>	<i>Dietas experimentais</i>			
	Controle	20mg FB/kg	40mg FB/kg	60mg FB/kg
Farelo de soja	53,7	53,7	53,7	53,7
Milho	31,0	31,0	31,0	31,0
Glúten de milho 60	8,2	8,2	8,2	8,2
Óleo de soja	2,0	2,0	2,0	2,0
Amido de milho	1,0	1,0	1,0	1,0
DL-metionina	0,01	0,01	0,01	0,01
Calcário calcítico	0,1	0,1	0,1	0,1
Fosfato bicálcico	2,9	2,9	2,9	2,9
Vitamina C ¹	0,06	0,06	0,06	0,06
Suplemento vitamínico e mineral ²	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal comum	0,5	0,5	0,5	0,5
BHT (antioxidante) ³	0,03	0,03	0,03	0,03
Fumonisina B1+B2	-	0,002	0,004	0,006
TOTAL	100	100	100	100
<i>Composição química avaliada da dieta (%)⁴</i>				
Proteína bruta	33,62	33,60	33,61	33,61
Matéria seca	89,52	89,51	89,50	89,52
Gordura	4,33	4,33	4,30	4,29
Matéria mineral	5,79	5,75	5,76	5,78

¹ Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo;

² Suplemento mineral e vitamínico: Composição/kg de produto: Vit. A=1.200.000 UI; vit. D3=200.000 UI; vit. E=12.000 mg; vit. K3=2.400 mg; vit. B1=4.800 mg; vit. B2=4.800 mg; vit. B6=4.000 mg; vit. B12=4.800 mg; ác. fólico=1.200 mg; pantotenato de cálcio=12.000 mg; vit. C=48.000 mg; biotina=48 mg; colina=65.000 mg; ácido nicotínico=24.000 mg; Fe=10.000 mg; Cu=600 mg; Mn=4.000 mg; Zn=6.000 mg; I=20 mg; Co=2 mg e Se=20 mg;

³ Butil-Hidroxi-tolueno (Antioxidante);

⁴ Composição com base na matéria natural.

Desempenho

Para a determinação do ganho em peso médio, todos os peixes foram pesados no primeiro, ao 15° e 30° dia de tratamento. Para determinar o consumo médio de ração, os recipientes contendo as dietas experimentais foram pesados semanalmente, e anotadas a diferença entre o peso inicial e o peso final. Os valores obtidos foram considerados depois de descontadas as mortalidades. Para a determinação da eficiência alimentar, foi

considerada a relação entre o ganho em peso médio dos peixes e o consumo médio de ração.

Expressão gênica

Para análise de expressão gênica, o fígado de seis animais de cada tratamento, previamente anestesiados com 90 mg/L de óleo de cravo, foram coletados aos 15 e 30 dias de experimento em RNA Holder (BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e armazenados a -80°C até a extração de RNA total.

O RNA total foi extraído 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. O tecido foi pesado, triturado e misturado ao Trizol (1 mL de Trizol por 35 mg de tecido) até completa dissociação. Após esta etapa, 200 µL de clorofórmio foram adicionados às amostras, e homogeneizadas manualmente durante um minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 8.000 x g e 4°C formando camadas separadas. Nesta etapa, foram recolhidos 500 µL da fase aquosa e transferidos para um tubo limpo contendo 500 µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas durante 15 minutos a 8.000 x g e 4°C. O sobrenadante foi descartado, e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 75% para limpeza. Os tubos foram novamente centrifugados a 8.000 x g durante cinco minutos, e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi seco por 15 minutos a 4°C e ressuspendido em água ultra pura livre 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, foi utilizado kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Nesta etapa, foram adicionadas a um tubo estéril livre de RNA 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo dT (50 µM de oligo (dT) 20) e 1 µL de tampão de emparelhamento. Os tubos foram incubados durante cinco minutos a 65°C e colocadas imediatamente em gelo durante 1 minuto. Em seguida, 10 µL de 2× First-Strand Reaction Mix e 2 µL de

solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III foram adicionadas aos tubos. A solução foi incubada durante 50 minutos a 50°C e cinco minutos a 85°C, e imediatamente colocado em gelo. Após esta etapa, as amostras foram armazenadas à -20°C até a sua utilização.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o corante fluorescente SYBR Green (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA).

Os *primers* utilizados para avaliação dos genes IGF-1 e GHR foram desenhados com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov (números de acesso: EU272149.1 e AY973232.1 respectivamente) utilizando o site www.idtdna.com. Três controles endógenos obtidos de Yang et al. (2013) foram testados: UBCE (enzima conjugadora de ubiquitina - XM_003460024), EF1A (fator de alongação 1 α - 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. Os *primers* utilizados neste experimento encontram-se na tabela 2.

Tabela 2- Sequência dos *primers* usados para as reações de PCR em tempo real

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i> (bp)
IGF-1 – F	CGATGTGCTGTATCTCCTGTAG	144
IGF-1 – R	CTCGCTCTCCACAGACAAAC	
GHR – F	TCTTGATTTGGGACTGTGGG	119
GHR – R	CGATGCCTTTGATTTGGGTG	
EF1- α – F	GCACGCTCTGCTGGCCTTT	250
EF1- α – R	GCGCTCAATCTCCATCCC	
UBCE – F	CTCTCAAATCAATGCCACTCC	130
UBCE – R	CCCTGGTGGAGGTTCTTGT	
B-ACT – F	TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG	217
B-ACT – R	TGTTGGCTTTGGGGTCA	

Todas as reações foram realizadas para um volume final de 12,5 μ L e em duplicatas. A análise das curvas de dissociação não revelaram qualquer presença de dímeros de *primers* ou produtos não específicos.

Análise estatística

Para avaliar a expressão relativa, os dados provenientes da análise de PCR em tempo real foram transformados utilizando-se $2^{-\Delta CT}$, como demonstrado por Livak &

Schmittgen, (2001). Os dados de expressão gênica e eficiência alimentar foram avaliados usando o procedimento REG Statement (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Os dados de ganho em peso médio foram analisados utilizando-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (duas idades e quatro níveis de inclusão de fumonisina) usando o procedimento GLM e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Os resultados foram expressos como médias e desvios-padrão.

Resultados

Nos primeiros 15 dias de experimento, foram observadas mortalidades, variando de 26,67% para o nível de 60 mg/Kg, 33,3% para 40 mg/Kg e 6,7% para 20 mg/Kg e tratamento controle. Após esse período, não houve mortalidade.

Os valores médios para as variáveis oxigênio dissolvido e pH foram 7,0 mg/L e 7,5 respectivamente. A temperatura média nos tanques durante o período experimental foi de $24,5 \pm 3,8$ °C, sem diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$). Não houve efeito significativo dos níveis de inclusão de fumonisina sobre o consumo de ração.

Foi observada redução significativa do ganho em peso para os animais tratados com dietas com inclusão de fumonisina ($P < 0,0001$) (Figura 1).

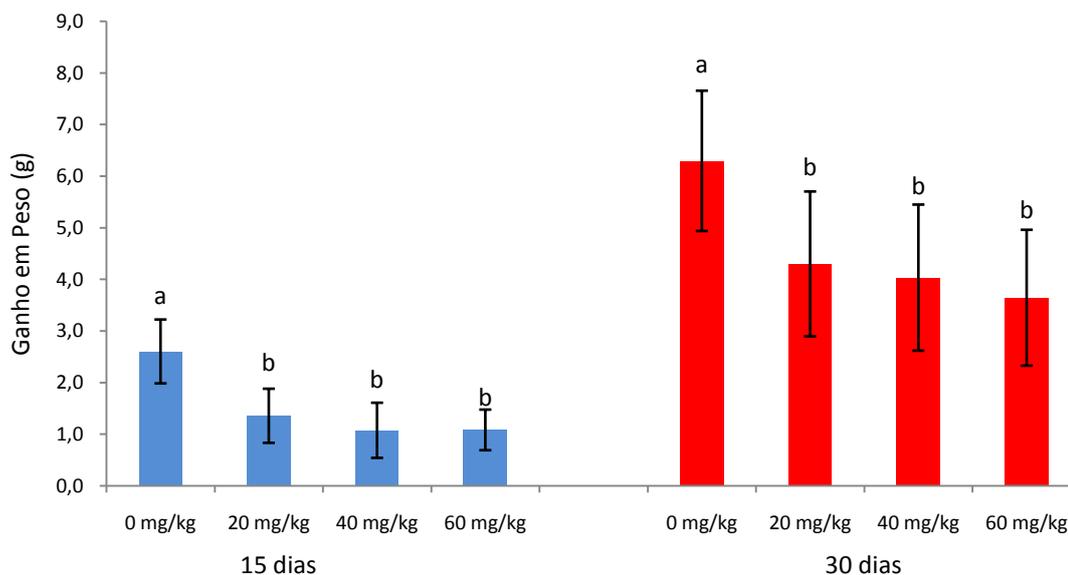


Figura 1. Efeito dos níveis de fumonisina e período de alimentação sobre o ganho em peso de alevinos de tilápia-do-Nilo.

A inclusão de fumonisina nas dietas afetaram significativamente a taxa de eficiência alimentar ($P < 0,0001$) com piores valores observados para os animais tratados com inclusão de fumonisina. Não houve efeito de interação dos níveis de fumonisina e do período de alimentação sobre a eficiência alimentar (Figura 2).

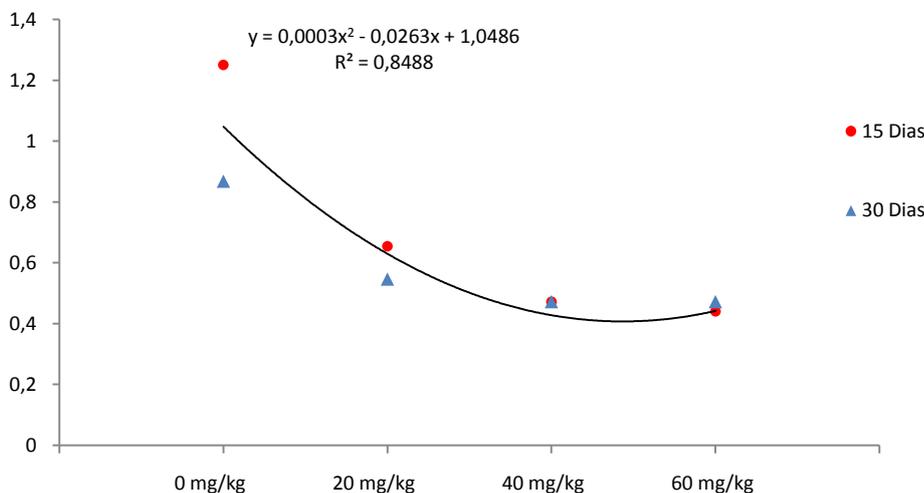


Figura 2. Eficiência alimentar de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com níveis crescentes de fumonisina aos 15 e 30 dias de tratamento.

Os resultados da expressão dos genes GHR e IGF-1 no fígado de alevinos tilápia-do-Nilo aos 15 e 30 dias de tratamento são mostrados na Figura 3. Houve efeito significativo de expressão de GHR para o período ($P = 0,0059$) e tratamento ($P = 0,0004$), porém não houve efeito de interação para a expressão deste gene ($P = 0,4360$). A inclusão de fumonisina na dieta reduziu a expressão de GHR aos 15 ($P < 0,0001$) e 30 dias ($P = 0,0019$). Houve efeito significativo de expressão de IGF-1, tanto para período ($P = 0,0011$), quanto para tratamento ($P < 0,0001$), porém não houve efeito de interação para a expressão deste gene ($P = 0,1173$). O mesmo padrão de redução da expressão encontrado em GHR foi observado para IGF-1 aos 15 ($P < 0,0001$) e 30 dias ($P = 0,0003$).

Os maiores níveis de expressão de GHR e IGF-1 foram observados nos animais que receberam dieta controle, enquanto que os menores valores de expressão ocorreram nos peixes alimentados com o nível de 60 mg/kg, independente do período.

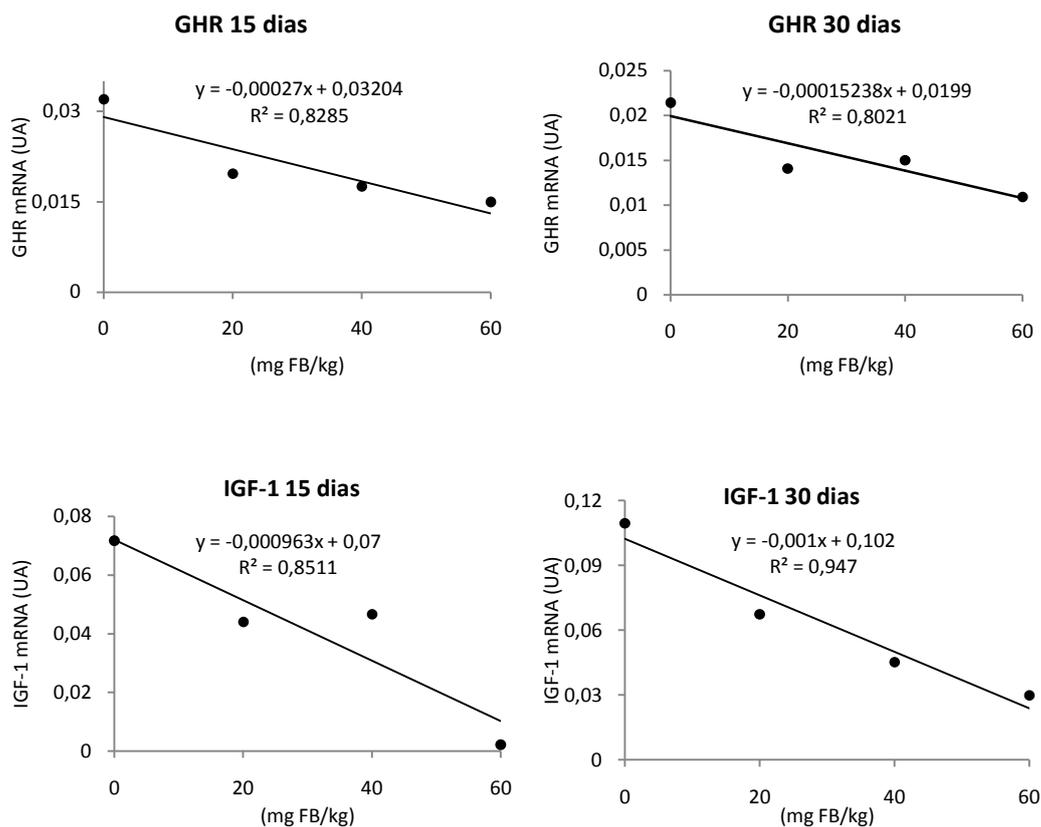


Figura 3. Efeitos do tempo de consumo e dos níveis de inclusão de fumonisina B1 + B2 sobre a expressão gênica de IGF-1 e GHR no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA).

Discussão

Um estudo realizado no Brasil com amostras de ração oriundas de fazendas produtoras de tilápias-do-Nilo demonstrou contaminação por fumonisina B1 em 98% das amostras avaliadas (Barbosa et al., 2013). Esta ampla presença de fumonisinas na dieta de peixes representa um motivo de preocupação, uma vez que esta micotoxina pode causar prejuízos a estes animais. Neste trabalho, os diferentes níveis de fumonisina avaliados promoveram redução do ganho em peso quando comparados ao tratamento controle aos 15 e aos 30 dias. Com duas e quatro semanas de tratamento, Tuan et al. (2003) observaram redução do ganho em peso de alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contendo níveis iguais ou superiores a 40mg/kg, sem mudanças significativas para o nível de 10mg/kg. Estes dados, juntamente ao observado em nosso experimento, sugerem que os menores níveis de fumonisina capazes de afetar o ganho em peso de alevinos de tilápia-do-Nilo esteja entre 10 e 20 mg FB/kg de ração, para 15 e 30 dias de exposição.

Pesquisas demonstram potencial de fumonisinas sobre a redução da eficiência alimentar e do consumo de ração em diversas espécies de animais (Haschek et al., 1992; Weibking et al., 1993a e b; LumLertdacha et al., 1995). Em alguns casos, a redução do consumo de ração está associada a ensaios realizados com grãos de milho naturalmente contaminados por fumonisina, podendo ocasionar problemas de palatabilidade da dieta (Haschek et al., 1992; Motelin et al., 1994). Em nosso estudo, a eficiência alimentar dos alevinos foi significativamente reduzida pela inclusão de fumonisina (Figura 2), entretanto, o consumo de ração não foi afetado, sugerindo que os mecanismos envolvidos na redução de crescimento observado nos alevinos que receberam dietas contaminadas com fumonisinas vão além da simples redução de consumo de ração.

A hepatotoxicidade em diversos animais consumindo dietas com fumonisina está associada à morte celular, seja ela, por apoptose ou necrose tecidual (Gelderblom et al., 2001). Além disso, regeneração celular espontânea é observada em resposta à fumonisina, o que pode ser um indício do desenvolvimento de células cancerígenas. Neste trabalho, não se observou alterações macroscópicas no fígado de tilápias alimentadas com doses crescentes de fumonisina, talvez o tempo de exposição e as doses utilizadas não tenham sido suficientes para provocar alterações visíveis.

Em peixes, assim como nos demais animais, o crescimento corporal envolve uma série de interações entre diferentes hormônios, por exemplo, os do eixo somatotrópico (GH- hormônio do crescimento, GHR- receptor do hormônio do crescimento e IGF-1- fator de crescimento semelhante à insulina). A ação de GH no organismo pode se dar de forma direta através da ligação na superfície das células do tecido alvo com seu receptor - GHR, ou de forma indireta, através da síntese e liberação de IGF-1 (Becker, 2001). A produção e liberação de IGF-1 no fígado e na maioria dos tecidos periféricos afeta diretamente diversos processos biológicos, como crescimento celular (Mommsen, 2001), síntese de DNA e de proteínas (Duan, 1998). A formação do complexo GH-GHR representa uma etapa necessária para a estimulação da síntese de IGF-1 e de sua liberação (Kita et al., 2005), havendo, desta forma, uma relação entre os níveis de GH, GHR e IGF-1.

O aumento dos níveis de fumonisinas foi inversamente relacionado com a expressão de IGF, sendo a menor expressão observada para 60 mg FB/kg aos 15 dias de tratamento (0,002 UA). Tanto aos 15 quanto aos 30 dias de tratamento, o mesmo padrão de expressão foi observado, sugerindo que quanto maior o nível de fumonisina menor é a expressão de IGF-1 independente do tempo de exposição (R^2 aos 15 dias = 0,8511; R^2

aos 30 dias = 0,9479). Não foram encontrados na literatura dados do efeito de fumonisinas sobre níveis de IGF-1, sejam eles circulantes ou de mRNA. Redução nos níveis circulante de IGF-1 foram observados por Wu et al. (2013) em suínos tratados com Deoxynivalenol (DON) outra micotoxina produzida pelo gênero *Fusarium*. Amuzie & Pestka (2010), também observaram redução dos níveis circulantes de IGF-1, entretanto, paradoxalmente encontraram aumento dos níveis de mRNA de IGF-1 em ratos tratados com DON.

Quanto à expressão gênica de GHR, observou-se um padrão semelhante ao encontrado para IGF-1, sendo que os maiores níveis de fumonisinas promoveram os menores níveis de mRNA de GHR tanto aos 15 ($R^2 = 0,8285$) quanto aos 30 dias de tratamento ($R^2 = 0,8021$). Também não foram encontrados na literatura dados do efeito de fumonisinas sobre níveis de GHR em tecido de nenhuma espécie animal. De modo geral, situações de estresse parecem afetar a expressão de GHR em peixes. Em salmão prateado, o desafio de manuseio, considerado um estresse fisiológico agudo, reduziu significativamente os níveis de mRNA de GHR na hipófise, fígado e músculo (Nakano et al., 2013). Em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), tanto a privação de alimento, quanto a administração exógena de cortisol reduziu significativamente a concentração de mRNA de GHR no fígado (Small et al., 2006). Estes autores observaram correlação positiva entre os níveis de mRNA de GHR e os níveis de IGF-1 circulante, o que também foi observado neste trabalho para os níveis de mRNA de GHR e IGF-1 ($r=0,67$ e $0,83$ para 15 e 30 dias, respectivamente).

Tecidos com alta taxa de síntese de esfingolípídeos *de novo*, como o fígado e rim, estão sujeitos aos efeitos provocados pela fumonisina em fases iniciais de exposição, entretanto outros tecidos com menores taxas de síntese de esfingolípídeos podem ser afetados pela toxina por meio da absorção de bases esfingóides oriunda da circulação ou células vizinhas (Desai et al., 2002). O aumento da entrada de cálcio na célula pode aumentar a proliferação celular. Neste contexto, é possível que fumonisinas, por meio de diversas enzimas e produtos intermediários envolvidos em seu metabolismo, afetem esta capacidade de proliferação celular.

A esfingosina (So) e esfingosina 1 fosfato (S1P) derivados do metabolismo da ceramida, são considerados segundos mensageiros capazes de mediar o crescimento e proliferação celular, e estão associados a alterações nos canais de cálcio em diversos tipos de cultura de células (Mathes et al., 1998; Blom et al., 2006). A ceramida 1 fosfato (C1P), outro derivado do metabolismo dos esfingolípídeos, também está

associada à proliferação celular em culturas de fibroblastos (Gomez-Muñoz et al., 1997), osteoblastos (Carpio et al., 1999) e células hipofisárias do tipo GH₄C₁, por meio de maior entrada de cálcio (Albert & Tashjian, 1984). A abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem são ainda regulados pela esfingosina quinase (SK), enzima responsável pela formação da SIP, como observados por Blom et al. (2006) em células GH₄C₁ de hipófise de ratos.

Considerando que a síntese e secreção de hormônios pela hipófise são dependentes da dinâmica de cálcio intracelular, é razoável sugerir que fumonisinas exercem papel importante nas funções da hipófise, como a síntese de GH. Embora pouco se saiba sobre os efeitos provocados pela fumonisina sobre a expressão do IGF-1, acredita-se que a SIP, seja capaz de regular processos celulares essenciais e esteja diretamente associado à atividade do IGF-1, seja pela modulação dos canais de cálcio, ou por outras rotas alternativas. A rota de sinalização SK/SIP parece estar envolvida com a atividade pro-mitogênica do IGF-1 (Bernacchioni et al., 2012).

É possível que um dos mecanismos pelos quais as fumonisinas afetem a expressão de GHR e IGF-1 seja dependente de proteína quinase C (PKC). A fumonisina B1, a esfinganina (Coward et al., 2009) e esfinganina 1 fosfato interferem diretamente na ativação da proteína PKC através de uma redistribuição celular, promovendo redução de PKC ativada no citoplasma e aumento na membrana plasmática (Gopee & Sharma, 2003; 2004). Compostos capazes de ativar PKC foram descritos como reguladores negativos da ação de GH através da redução da abundância de GHR na membrana plasmática (Rui et al., 2000). Desta forma, é possível que a inibição da ceramida sintase por fumonisina B1 conduza ao acúmulo de PKC na membrana, prejudicando desta forma a ação dos hormônios do eixo somatotrópico, resultando a longo prazo, em menores taxas de crescimento.

Este é o primeiro estudo que relata a expressão dos genes GHR e IGF-1 em animais de produção desafiados com a micotoxina fumonisina. Mesmo o menor nível de fumonisina avaliado afetou significativamente o desempenho e a expressão de GHR e IGF-1, havendo a necessidade de futuros estudos que avaliem níveis entre 10 e 20mg FB/kg de inclusão, e desta forma, determinar os níveis exatos toleráveis para alevinos de tilápia-do-Nilo. Além disto, estudos que avaliem outras fases de desenvolvimento de tilápias poderão esclarecer melhor os mecanismos que envolvem o desafio por fumonisina, e a relação da idade com a tolerância.

Conclusão

1. O desafio com níveis crescentes de fumonisinas B1 + B2 reduz a expressão gênica de GHR e IGF-1 no fígado, e o crescimento corporal de alevinos de tilápia-do-Nilo, tanto aos 15, quanto aos 30 dias de consumo.

Referências

- Albert, P.R.; Tashjian, A.H. Jr. Relationship of thyrotropin-releasing hormone-induced spike and plateau phases in cytosolic free Ca²⁺ concentrations to hormone secretion. Selective blockade using ionomycin and nifedipine, **J Biol Chem.**, 25;259(24):15350-63, 1984.
- Amuzie, C.J; Pestka, J.J. Suppression of insulin-like growth factor acid-labile subunit expression--a novel mechanism for deoxynivalenol-induced growth retardation. **Toxicol Sci.** Feb;113(2):412-21, 2010.
- 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. and Rosa, C.A.R. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, Brazil. **International Aquatic Research**, 5:3, 2013.
- Becker, K.L. **Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism**, 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins (LWW), Philadelphia, 2001.
- Bernacchioni, C.; Cencetti, F.; Blescia, S.; Donati, C.; Bruni, P. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate axis: a new player for insulin-like growth factor-1- induced myoblast differentiation. **Skeletal Muscle**, v.2:15. 10.1186/2044-5040-2-15, 2012.
- Blom, T.; Bergelin, N.; Slotte, J.P.; Törnquist, K. Sphingosine kinase regulates voltage operated calcium channels in GH4C1 rat pituitary cells. **Cell Signal**. 18(9):1366-75, 2006.
- 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**. 172, 29–36, 2001.
- Carpio, L.C.; Stephan, E.; Kamer, A.; Dziak, R. Sphingolipids stimulate cell growth via MAP kinase activation in osteoblastic cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 61(5):267-73, 1999.
- Chuturgoon, A.; Phulukdaree, A.; Moodley, D. Fumonisin B1 induces global DNA hypomethylation in HepG2 cells. An alternative mechanism of action. **Toxicology**, 315, 65– 69, 2014.
- Coward, J.; Ambrosini, G.; Musi, E.; Truman, J.P.; Haimovitz-Friedman, A.; Allegood, J.C.; Wang, E.; Merrill Jr, A.H.; Schwartz, G.K. Safingol (L-threo-sphinganine)

- induces autophagy in solid tumor cells through inhibition of PKC and the PI3-kinase pathway. **Autophagy**. Feb;5(2):184-93, 2009.
- Desai, K.; Sullards, M.C.; Allegood, J.; Wang, E.; Schmelz, E.M.; Hartl, M.; Humpf, H.U.; Liotta, D.C.; Peng, Q.; Merrill, A.H Jr. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. **Biochim Biophys Acta**. 30;1585(2-3):188-92, 2002.
- Domijan, A.M.; Abramov, A.Y. Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis--implication to mechanism of cell toxicity. **Int J Biochem Cell Biol**. Jun; 43(6):897-904, 2011.
- Duan, C. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. **J. Nutr**. 128, 306S–314S, 1998.
- Gelderblom, W.C.A.; Abel, S.; Smuts, C.M.; Marnewick, J.; Marasas, W.F.O.; Lemmer, E.R. and RamLjak, D. Fumonisin-Induced Hepatocarcinogenesis: Mechanisms Related to Cancer Initiation and Promotion. **Environmental Health Perspectives**. V109 (2), p291-300, 2001.
- Gomez-Muñoz, A.; Frago, L.M.; Alvarez, L.; Varela-Nieto, I. Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate, **Biochem J.**, 15;325 (Pt 2):435-40, 1997.
- Gopee, N.V.; Sharma, R.P. Selective and transient activation of protein kinase C alpha by fumonisin B1, a ceramide synthase inhibitor mycotoxin, in cultured porcine renal cells. **Life Sci**. v6; 74(12):1541-59, 2004.
- Gopee, N.V.; Sharma, R.P. Sphingoid bases and their phosphates: transient activation and delayed repression of protein kinase C isoforms and their possible involvement in fumonisin B1 cytotoxicity. **Toxicology**. v3;187(2-3):239-50, 2003.
- Hannun, Y.A. The Sphingomyelin Cycle and the Second Messenger Function of Ceramide. **The Journal of Biological Chemistry**, 269 (5), 3125-3128, 1994.
- Haschek, W.M.; Motelin, G.; Ness, D.K.; Harlin, K.S.; Hall, W.F.; Vesonder, R.F.; Peterson, R.E.; Beasley, V.R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. **Mycopathologia**. v.117(1-2):83-96, 1992.
- Kita, K.; Nagao, K.; Okumura, J. Nutritional and tissue specificity of IGF-1 and IGFBP-2 gene expression in growing chickens — a review. **Asian Australas. J. Anim. Sci**. 18, 747–754, 2005.

- Kovačić, S.; Pepeljnjak, S.; Petrincec, Z.; Klarić, M.S. Fumonisin B1 neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio l.*). **Arh Hig Rada Toksikol.** V.60:419-426, 2009.
- Krauss, G. **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation.** 4th Ed. Wiley-VCH. p. 15. ISBN 978-3527313976, 2008.
- 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(4):402-8, 2001.
- LumLertdacha, S.; Lovell, R.T.; Shelbyb, 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, 201-218, 1995.
- Mathes, C.; Fleig A.; Penner, R. Calcium release-activated calcium current (ICRAC) is a direct target for sphingosine. **J Biol Chem.** 25;273(39):25020-30, 1998.
- Merrill Jr., A. H.; Sullards, C.; Wang, E.; Voss, K. A.; Riley, R. T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environmental Health Perspectives**, v.109, n.2, p.283-289, 2001.
- Merrill Jr., A.H.; Wang, E.; Gilchrist, D.G.; Riley, R. T. Fumonisin and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. **Advances in Lipid Research: Sphingolipids and Their Metabolites**, v.26, p. 215-234, 1993.
- Mommsen, T.P. Paradigms of growth in fish. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** v.129, 207–219, 2001.
- Motelin GK, Haschek WM, Ness DK, Hall WF, Harlin KS, Schaeffer DJ, Beasley VR. Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisina mycotoxins. *Mycopathologia* 126:27-40 (1994).
- Nakano, T.; Afonso, L.O.B.; Beckman, B.R.; Iwama, G.K.; Devlin, R.H. Acute Physiological Stress Down-Regulates mRNA Expressions of Growth-Related Genes in Coho Salmon. **PLoS ONE**, v8(8):e71421, 2013.
- Olivera, A.; Spiegel, S. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. **Nature**, 365: 557-560, 1993.
- Pepeljnjak, S.; Petrincec, Z.; Kovacic, S.; Segvic, M. Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio L.*) on feed amended with fumonisin B1. **Mycopathologia** 156: 139–145, 2002.
- Riley, R.T.; Enongene, E.; Voss, K.A.; Norred, W.P.; Meredith, F.I.; Sharma, R.P.; Spitsbergen, J.; Williams, D.E.; Carlson, D.B.; Merrill, A.H. Jr. Sphingolipid

- perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* v.109(2) p.301-8, 2001.
- Riley, R.T.; Wang, E.; Merrill Jr, A.H. Liquid chromatographic determination of sphinganine and sphingosine: use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. **J AOAC Int.**, 77:533–540, 1994.
- Rui, L.; Archer, S.F.; Argetsinger, L.S.; Carter-Su, C. Platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid inhibit growth hormone binding and signaling via a protein kinase C-dependent pathway. **J Biol Chem**, v.28;275(4):2885-92, 2000.
- Small, B.C.; Murdock, C.A.; Waldbieser, G.C.; Peterson, B.C. Reduction in channel catfish hepatic growth hormone receptor expression in response to food deprivation and exogenous cortisol. **Domest Anim Endocrinol.** v;31(4):340-56, 2006.
- Smith, E. R.; Merrill Jr, A. H. Differential roles of de novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the “burst” of free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and n-acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in culture. **J. Biol. Chem.** 270, 18749–18758, 1995.
- Sperling P, Heinz E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1632:1-15, 2003.
- Statistical Analyses System - SAS. **SAS/STAT 2000:** version 8. Cary: 2000.
- 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, 515–528, 2003.
- 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):14486-90, 1991.
- Weibking, T.S.; Ledoux, D.R.; Bermudez, A.J.; Turk, J.R.; Rottinghaus, G.E. Effects of Feeding *Fusarium moniliforme* Culture Material, Containing Known Levels of Fumonisin B1, on the Young Broiler Chick. **Poultry Science**, v.72 (3): 456-466, 1993a.
- Weibking, T.S.; Ledoux, D.R.; Brown, T.P.; Rottinghaus, G.E. Fumonisin Toxicity in Turkey Poults. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5(1) 75-83, 1993b.
- Wu, L.; Wang, W.; Yao, K.; Zhou, T.; Yin, J.; Li, T.; Yang, L.; He, L.; Yang, X.; Zhang, H.; Wang, Q.; Huang, R.; Yin, Y. Effects of Dietary Arginine and

Glutamine on Alleviating the Impairment Induced by Deoxynivalenol Stress and Immune Relevant Cytokines in Growing Pigs. **PLoS ONE**, v.8(7): e69502, 2013.

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, 183–192, 2013.

CAPÍTULO III

Expressão gênica de IGF-1 e GHR em alevinos e juvenis de tilápias-do-Nilo desafiados com fumonisina B1 + B2

Expressão gênica de IGF-1 e GHR em alevino e juvenis de tilápias-do-Nilo desafiados com fumonisinas B1 + B2

Resumo - Fumonisinas são micotoxinas produzidas durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* que podem causar piora no desempenho dos animais. Neste estudo, a hipótese de que fumonisinas afetam o desempenho e a expressão gênica de IGF-1 e GHR em alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo foi testada. Um ensaio com 20 dias de duração foi realizado, onde alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo receberam dietas com e sem a inclusão de fumonisina B1 + B2 (50 mg FB/kg de ração) para avaliar seus efeitos sobre o ganho em peso médio (GPM), consumo médio de ração (CMR), conversão alimentar aparente (CAA) e expressão de mRNA de GHR e IGF-1 no fígado. Fumonisinas reduziram significativamente o GPM ($p < 0,0001$) e pioraram a CAA ($p < 0,0001$) para alevinos, porém não afetaram o CMR. Para juvenis, a inclusão de fumonisinas não afetou o CMR, CAA e GPM. A expressão gênica de GHR e IGF-1, tanto para alevinos, quanto para juvenis, foi significativamente reduzida pela inclusão de fumonisinas ($p < 0,0001$). Estes resultados indicam que fumonisinas B1 + B2 afetam a expressão hepática de GHR e IGF-1 em alevinos e juvenis de tilápias-do-Nilo, porém seus efeitos sobre o desempenho são dependentes da fase de criação.

Termos para indexação: expressão gênica, desempenho, *Fusarium*, *Oreochromis niloticus*

Gene expression of IGF-1 and GHR in fry and juvenile of Nile tilapia challenged with fumonisins B1 + B2

Abstract - Fumonisins are mycotoxins produced during the secondary metabolism of the fungus *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* that can cause worsen in animal performance. In this study, the hypothesis that fumonisin affect the performance and the gene expression of IGF-1 and GHR in fry and juveniles of Nile tilapia was tested. A test was conducted with 20 days duration, where fry and juveniles of Nile tilapia were fed diets with and without the inclusion of fumonisin B1 + B2 (50 mg FB / kg diet) to evaluate its effects on average weight gain (AWG), average feed intake (AFI), aparent feed conversion (AFC) and GHR mRNA expression and IGF-1 in the liver. Fumonisins reduced significantly the MWG ($p < 0.0001$) and worsened the AFC ($p < 0.0001$) to fry, but did not affect the MFI. For juveniles, the inclusion of fumonisin did not affect the MFI, AFC and MWG. The GHR gene expression and IGF-1 for fry and for juveniles were significantly reduced by the inclusion of fumonisins ($p < 0.0001$). These results indicate that fumonisins B1 + B2 affects the hepatic expression of GHR and IGF-1 in fry and juveniles of Nile tilapia, but their effects on the performance are dependent of the development phase.

Index terms: gene expression, performance, *Fusarium*, *Oreochromis niloticus*

Introdução

Encontrada predominantemente no milho, as fumonisinas são produzidas durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, (Gelderblom et al., 1988) e podem causar piora no desempenho dos animais que as consomem e, conseqüentemente, reduzir a rentabilidade da atividade (Jobim et al., 2001). A *European Food Safety Authority* (EFSA) desenvolveu um manual apresentando níveis aceitáveis de fumonisinas em rações, silagens e suplementos para algumas espécies, variando de 5mg/kg de ração para equinos, suínos, coelhos e animais de companhia, a 50 mg/kg de ração para ruminantes adultos (EFSA, 2005). Para peixes, entretanto, demonstram que os níveis experimentais de fumonisinas considerados tóxicos podem variar de acordo com a espécie, idade e tempo de exposição dos animais (Brown et al., 1994; LumLertdacha et al., 1995; Pepeljnjak et al., 2002; Tuan et al., 2003; Petrinec et al., 2004).

A ação das fumonisinas nos animais envolve o bloqueio da biossíntese dos esfingolipídios através da inibição da enzima ceramida sintase. Esta enzima promove a bioconversão das bases esfingóides esfinganina e esfingosina à ceramida, que é um precursor dos esfingolipídios. Na presença de fumonisina, esta bioconversão é interrompida devido à semelhança estrutural existente entre a micotoxina e as bases esfingóides (Wang et al., 1991; Riley et al., 2001; Riley e Voss, 2006), reduzindo as concentrações de ceramida. A inibição da biossíntese dos esfingolipídios altera inúmeras funções celulares e vias de sinalização, incluindo apoptose e crescimento celular (Stockmann-Juvala et al., 2008).

Estudos demonstram que a intoxicação por fumonisinas pode afetar a taxa de ganho em peso em frangos (Ledoux et al., 1992; Weibking et al., 1993) e peixes (Lumlertdacha et al., 1995), e que há um possível envolvimento entre os metabólitos intermediários de ceramida e hormônios diretamente envolvidos com o crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Stewart et al., 1999; Bernacchioni et al., 2012), sugerindo um possível mecanismo de ação indireta de fumonisinas sobre a expressão de genes relacionados ao crescimento corporal, como IGF-1, GH e seu receptor.

Com este estudo, objetivamos testar a hipótese de que a presença de fumonisinas nas dietas afetam o desempenho produtivo e a expressão de genes relacionados ao crescimento em tilápia-do-Nilo em diferentes fases. Desta forma, foi realizado um ensaio mantendo alevinos e juvenis de tilápias-do-Nilo, alimentados com dietas com e

sem adição de fumonisinas B1 + B2, e avaliadas alterações no ganho em peso médio (GPM), conversão alimentar aparente (CAA), consumo médio de ração (CMR), e a expressão dos genes IGF-1 e GHR em tecido hepático.

Material e métodos

Os procedimentos neste experimento foram realizados de acordo com regulamento da comissão de ética no uso de animais (CEUA - UniCesumar).

Delineamento Experimental e Animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá - UEM, durante o mês de outubro de 2014. Foram utilizados 90 peixes revertidos sexualmente para macho, pertencentes ao grupo genético GIFT x Tailandesa, sendo 45 alevinos com peso inicial de $2,63 \pm 0,39$ g e 45 juvenis com peso inicial de $75,9 \pm 11$ g. Os peixes foram distribuídos em seis 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 alojados 15 peixes, sendo três tanques com alevinos, e três tanques com juvenis.

Os animais passaram por um período de adaptação às instalações 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. Já as variáveis oxigênio dissolvido e pH foram aferidas diariamente pela manhã por meio de kit individual colorimétrico.

Dietas experimentais

Foram elaboradas duas dietas, uma para alevinos (3000 kcal ED/kg e 33% PD) e outra para juvenis (3300 kcal ED/kg e 29% PD). Inicialmente, os ingredientes foram moídos, peneirados e homogeneizados, e posteriormente separadas em duas partes, sendo uma utilizada como dieta controle, e a outra acrescida de micotoxina fumonisina (B1 + B2) afim de obter uma concentração de 50mg/kg de ração. Ao fim, foram elaboradas quatro dietas experimentais: GRUPO 1 – controle para alevinos, GRUPO 2 - 50 mg FB/kg de ração para alevinos, GRUPO 3 – controle para juvenis, GRUPO 4 - 50

mg FB/kg de ração para juvenis. As dietas foram peletizadas, secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 48 horas e desintegradas em moedor manual. As partículas foram classificadas de acordo com a granulometria de 1 a 2mm para alevinos, e de 4 a 5mm para juvenis. A composição química das dietas foi avaliada de acordo com protocolos descritos por Silva & Queiroz, 2006. Em ambos os grupos, o arraçoamento foi realizado manualmente três vezes/dia até saciedade aparente dos peixes, às 8, 12, e 18 horas.

Tabela 1- Composição percentual e química das dietas experimentais

<i>Ingredientes (%)</i>	<i>Dietas experimentais</i>			
	<i>Controle (Alevinos)</i>	<i>Fumonisina (Alevinos)</i>	<i>Controle (Juvenis)</i>	<i>Fumonisina (Juvenis)</i>
Farelo de soja	53,70	53,70	53,54	53,54
Milho	31,00	31,00	10,37	10,37
Glúten de milho 60	8,20	8,20	-	-
Amido de milho	1,00	1,00	-	-
Quirera de arroz	-	-	12,00	12,00
Farelo de trigo	-	-	12,00	12,00
Hidrolisado de fígado de aves	-	-	2,00	2,00
L-lisina HCl	-	-	0,20	0,20
L-treonina	-	-	0,20	0,20
DL-metionina	0,01	0,01	0,20	0,20
Óleo de soja	2,00	2,00	5,20	5,20
Calcário calcítico	0,10	0,10	0,50	0,50
Fosfato bicálcico	2,90	2,90	2,67	2,67
Vitamina C ¹	0,06	0,06	0,10	0,10
Suplemento vitamínico e mineral ²	0,50	0,50	0,50	0,50
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT (antioxidante) ³	0,03	0,03	0,02	0,02
Fumonisina B1+B2 (mg/kg)	-	0,005	-	0,005
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Composição química avaliada das dietas (%)⁴</i>				
Proteína bruta	33,62		30,18	
Matéria seca	89,52		91,62	
Gordura	4,33		7,35	
Matéria mineral	5,79		2,89	

¹ Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo;

² Suplemento mineral e vitamínico: Composição/kg de produto: Vit. A=1.200.000 UI; vit. D3=200.000 UI; vit. E=12.000 mg; vit. K3=2.400 mg; vit. B1=4.800 mg; vit. B2=4.800 mg; vit. B6=4.000 mg; vit. B12=4.800 mg; ác. fólico=1.200 mg; pantotenato de cálcio=12.000 mg; vit. C=48.000 mg; biotina=48 mg; colina=65.000 mg; ácido nicotínico=24.000 mg; Fe=10.000 mg; Cu=600 mg; Mn=4.000 mg; Zn=6.000 mg; I=20 mg; Co=2 mg e Se=20 mg;

³Butil-Hidroxi-tolueno (Antioxidante);

⁴Composição com base na matéria natural de acordo com as análises laboratoriais realizadas.

Desempenho

O período experimental foi de 20 dias. Para a determinação do ganho em peso médio (GPM) todos os peixes foram pesados no primeiro e 20º dia de tratamento. Para determinar o consumo médio de ração (CMR), os recipientes contendo as dietas experimentais foram pesados semanalmente, e anotadas as diferenças entre o peso inicial e o peso final do recipiente. Os valores obtidos foram considerados depois de descontadas as mortalidades. Para a determinação da conversão alimentar aparente (CAA), foi considerada a relação entre o CMR e o GPM dos peixes de cada tanque.

Expressão gênica

Ao final do período experimental, amostras de fígado de seis animais de cada tratamento, previamente anestesiados com 90 mg/L de óleo de cravo, foram coletadas e armazenados em RNA Holder (BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brasil) a -80°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, foi utilizado kit Super Script™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o corante fluorescente SYBR Green (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA).

Os *primers* utilizados para avaliação dos genes IGF-1 e GHR foram desenhados com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov (números de acesso: EU272149.1 e AY973232.1 respectivamente) utilizando o site www.idtdna.com. Três controles endógenos obtidos de Yang et al. (2013) foram testados: UBCE (enzima conjugadora de ubiquitina - XM_003460024), EF1A (fator de alongação 1 α - AB075952) e ACTB (β actina - XM_003455949). Destes, ACTB foi selecionado, pois apresentou melhor eficiência (entre 90 e 110%) e não variou estatisticamente entre os tratamentos. Os *primers* utilizados neste experimento encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2- Sequência dos *primers* usados para as reações de PCR em tempo real

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i> (bp)
IGF-1 – F	CGATGTGCTGTATCTCCTGTAG	144
IGF-1 – R	CTCGCTCTCCACAGACAAAC	
GHR – F	TCTTGTATTTGGGACTGTGGG	119
GHR – R	CGATGCCTTTGATTTTGGGTG	
EF1- α – F	GCACGCTCTGCTGGCCTTT	250
EF1- α – R	GCGCTCAATCTCCATCCC	
UBCE – F	CTCTCAAATCAATGCCACTTCC	130
UBCE – R	CCCTGGTGGAGGTTCTTGT	
BACT – F	TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG	217
BACT – R	TGTTGGCTTTGGGGTCA	

Todas as reações foram realizadas para um volume final de 12,5 μ L e em duplicatas. A análise das curvas de dissociação não revelou qualquer presença de dímeros de *primers* ou produtos não específicos.

Análise estatística

Os dados provenientes da análise de PCR em tempo real foram transformados utilizando $2^{-\Delta CT}$. Foram testados os efeitos da inclusão de 50 mg/Kg de fumonisinas B1 + B2, efeito de fase e as interações, num esquema fatorial 2 x 2. Os dados de expressão gênica e desempenho foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM

do SAS e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão.

Resultados

Os valores médios e desvios padrão das características GPM, CMR e CAA em alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo em função da inclusão de fumonisina nas dietas são mostrados na Tabela 3. O consumo de ração não foi afetado pela inclusão de fumonisina em nenhuma das fases avaliadas. Redução significativa do GPM e pior CAA foram observados para alevinos de tilápias tratadas com 50mg FB/kg de ração ($P < 0,0001$), entretanto estas características não foram afetadas em juvenis.

Tabela 3. Desempenho de tilápias-do-Nilo desafiadas com dietas contendo fumonisina.

	<i>Alevinos</i>			<i>Juvenis</i>		
	GPM (g)	CMR (g)	CAA	GPM (g)	CMR (g)	CAA
<i>Controle</i>	3,96 \pm 0,65 ^a	4,09 \pm 0,04 ^a	1,06 \pm 0,17 ^a	75,47 \pm 18,10 ^a	89,76 \pm 5,86 ^a	1,19 \pm 0,10 ^a
<i>Fumonisina</i>	1,54 \pm 0,40 ^b	4,10 \pm 0,05 ^a	2,82 \pm 0,71 ^b	84,32 \pm 20,90 ^a	93,76 \pm 22,30 ^a	1,10 \pm 0,11 ^a
<i>CV%</i>	21,17	1,14	20,78	24,38	15,16	9,27
<i>p-valor</i>	<0,0001	ns	<0,0001	ns	ns	ns

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ns – Não significativo.

Os valores médios e desvios padrão da expressão relativa dos genes IGF-1 e GHR no fígado de alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo em função da inclusão de fumonisina são mostrados na Figura 1. A expressão gênica de IGF-1 e GHR foi significativamente alterada pelas dietas. Redução dos níveis relativos de mRNA de IGF-1 e GHR foi observada para tilápias desafiadas com 50mg FB/kg de ração ($P < 0,0001$) quando comparadas às dietas controle para as duas fases de criação. Houve diferença de expressão dos genes entre as fases de criação, sendo os menores valores encontrados em alevinos para ambos os genes avaliados ($P < 0,0001$).

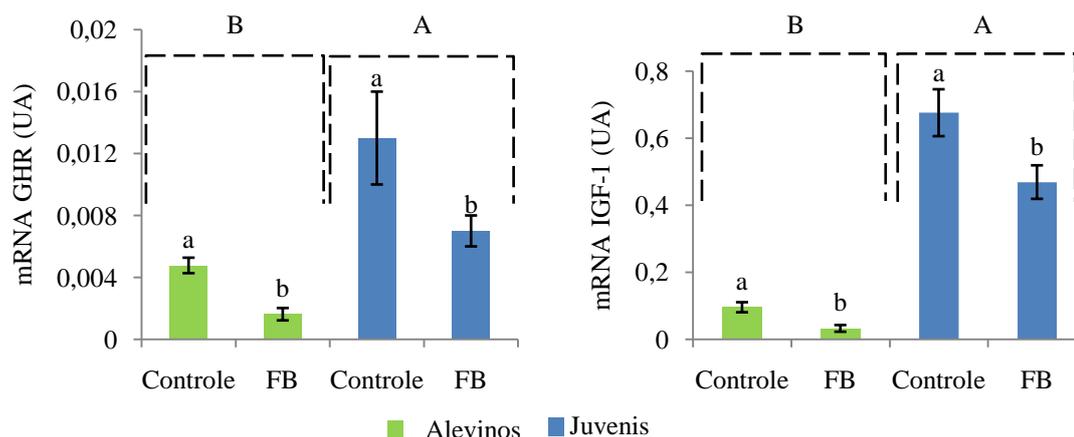


Figura 1. mRNA de GHR e IGF-1 em unidades arbitrárias (UA) para alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo desafiados com fumonisina. Letras maiúsculas sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos (alevinos e juvenis). Letras minúsculas sobre as barras representam diferença estatística entre tratamentos dentro do mesmo grupo. Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Discussão

As fumonisinas podem afetar o desempenho de peixes, e este efeito parece estar relacionado à idade ou peso dos animais. LumLertdacha et al. (1995) observaram que a concentração de 20 mg de FB1/kg de ração era capaz de reduzir o ganho em peso de bagres do canal de um ano de idade (aproximadamente 1,2g), porém não afetava o ganho em peso de animais com dois anos (aproximadamente 31g), sugerindo que a redução do ganho em peso causada por fumonisina é dependente da idade e/ou tamanho dos bagres. Tuan et al. (2003) também observaram menores valores de GPM para alevinos (aproximadamente 2,7g) de tilápia-do-Nilo que consumiram dietas contendo valores superiores a 40mg FB/kg de ração, corroborando parcialmente com nosso estudo, onde o fornecimento de dietas contaminadas com 50mg FB/kg de ração durante 20 dias causou a redução do crescimento em alevinos, porém, não afetou o ganho em peso corporal em juvenis de tilápia-do-Nilo, o que sugere maior resistência destes animais a esta micotoxina. Não foram encontrados na literatura estudos que demonstrem quais concentrações de fumonisina dietética são capazes de afetar o ganho em peso médio em tilápias-do-Nilo na fase juvenil.

O consumo de ração não foi afetado em nenhum dos grupos avaliados, sugerindo que o menor ganho em peso observado nos alevinos consumindo dieta contaminada com fumonisina seja decorrente de efeito direto da micotoxina e não por redução de entrada de alimento. O mecanismo exato pelo qual fumonisinas podem afetar o ganho

em peso dos animais ainda não foi completamente elucidado, entretanto, alguns estudos tem evidenciado relação indireta entre compostos intermediários do metabolismo de esfingolípídios, como ceramida e esfingosina 1 fosfato (S1P), e elementos do eixo somatotrópico, como IGF-1 e GHR (Bernacchioni et al., 2012; Stewart et al., 1999).

De maneira direta, a ceramida é capaz de aumentar significativamente a fosforilação dos receptores de IGF-1, potencializando a ação do fator de crescimento (Stewart et al., 1999). Fumonisininas são capazes de diminuir a síntese de ceramida por meio de competição direta pelo sítio de ativação da enzima ceramida sintase com bases esfingóides (Wang et al., 1991), podendo, desta forma, reduzir as taxas de fosforilação de receptores de IGF-1. Além disso, a via de sinalização que envolve a enzima esfingosina quinase/S1P, derivada de moléculas de ceramida, está envolvido na regulação da ação biológica exercida por IGF-1, como demonstrado por Bernacchioni et al. (2012).

Em nosso trabalho, a expressão dos genes IGF-1 e GHR foi avaliada em tecido hepático de alevinos e juvenis de tilápia-do-Nilo, consumindo dietas contendo 50mg FB/kg de ração apresentando redução significativa da expressão de mRNA, tanto de IGF-1, quanto de GHR, para os dois grupos avaliados, sugerindo que a redução da expressão destes genes seja uma resposta primária ao desafio com fumonisininas.

O mecanismo pelo qual fumonisininas afetam a expressão de GHR no fígado das tilápias pode se dar através da proteína quinase C (PKC). Fumonisininas, esfinganina (Coward et al., 2009) e S1P afetam diretamente a atividade de PKC através da redistribuição celular, reduzindo PKC ativada no citoplasma e aumentando PKC ativada na membrana plasmática (Gopee & Sharma, 2003; 2004). Desta forma, é possível que a capacidade de fumonisininas em ativar PKC na membrana celular reduza a abundância de GHR na membrana como demonstrado por Rui et al. (2000).

Em condições normais, a expressão de GHR é detectada em grande abundância no fígado (Jiang & Lucy, 2001), onde tem sido sugerida como biomarcador para monitorar o crescimento em animais (Slifierz et al., 2013), sendo que maiores expressões estão associadas a maior ganho em peso corporal (Mathews et al., 1988; Coschigano et al., 2003; Slifierz et al., 2013). Do mesmo modo, as taxas de IGF-1 plasmática estão correlacionadas com a taxa de crescimento em diferentes animais (Breier et al., 1988; Suttie et al., 1991; Gatford et al., 1996) e podem ser usadas como indicador de crescimento relativo (Stick et al., 1998, Carnevali et al., 2005). Em maiores níveis

circulantes, o IGF1 está associado à síntese protéica e, redução na degradação de proteínas (Lee et al., 2004).

O eixo GH/IGF de peixes é semelhante ao observado em mamíferos (Duan, 1998; Pérez-Sánchez & Le Bail 1999) e reduções nos padrões de expressão de gênica tanto de GHR quanto de IGF1 podem ocorrer quando o status nutricional do animal é alterado (Dauncey et al., 1994; Weller et al., 1994; Brameld et al., 1996, 1999; Duan, 1998). Em peixes, os sinais clínicos da intoxicação por micotoxinas podem variar, tanto em função das concentrações nas rações, quanto do período ao qual o animal é submetido ao alimento contaminado.

Os resultados observados neste trabalho sugerem que juvenis são mais resistentes aos efeitos do desafio com fumonisinas B1 + B2 do que alevinos. É possível que maiores períodos de exposição dos juvenis a esta concentração promova redução de desempenho, uma vez que a expressão de IGF-1 e GHR foi reduzida, e que a expressão gênica precede a síntese protéica.

De acordo com a literatura consultada este é o primeiro relato da ação de fumonisinas sobre o desempenho e a expressão gênica de GHR e IGF-1 entre diferentes fases de crescimento de tilápia-do-Nilo.

Conclusão

1. Resposta à dietas contendo fumonisinas envolvem um mecanismo de sub-regulação da expressão gênica de IGF-1 e GHR no fígado de alevinos e juvenis de tilápia do Nilo.
2. Juvenis de tilápia-do-Nilo são aparentemente mais tolerantes ao desafio por fumonisinas quando comparados à alevinos desta mesma espécie.

Referências

- Bernacchioni, C.; Cencetti, F.; Blescia, S.; Donati, C.; Bruni, P. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate axis: a new player for insulin-like growth factor-1- induced myoblast differentiation. **Skeletal Muscle**, v.2:15. 10.1186/2044-5040-2-15, 2012.
- Brameld, J.M.; Atkinson, J.L.; Saunders, J.C.; Pell, J.M.; Buttery, P.J.; Gilmour, R.S. Effects of growth hormone administration and dietary protein intake on insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA Expression in porcine liver, skeletal muscle, and adipose tissue. **J Anim Sci**. 74(8) , 1832-1841, 1996.
- Brameld, J.M.; Gilmour, R.S.; Buttery, P.J. Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes. **J Nutr**. v.129(7) , 1298-1306, 1999.
- Breier, B.H.; Gluckman, P.D.; Bass, J.J. Influence of nutritional status and oestradiol-17 beta on plasma growth hormone, insulin-like growth factors-I and -II and the response to exogenous growth hormone in young steers. **J Endocrinol**. 118(2) , 243-250 , 1988.
- Brown, D.W.; McCoy, C.P.; Rottinghaus, G.E. Experimental feeding of Fusarium moniliforme culture material containing fumonisin B1 to channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **J Vet Diagn Invest**. v.6(1) , 123-124, 1994.
- Carnevali, O.; Cardinali, M.; Maradonna, F.; Parisi, M.; Olivotto, I.; Polzonetti-Magni, AM.; Mosconi, G.; Funkenstein, B. Hormonal regulation of hepatic IGF-1 and IGF-1I gene expression in the marine teleost *Sparus aurata*. **Mol Reprod Dev**. 71(1) , 12-18, 2005.
- Coschigano, K.T.; Holland, A.N.; Riders, M.E.; List, E.O.; Flyvbjerg, A.; Kopchick, J.J. Deletion, But Not Antagonism, of the Mouse Growth Hormone Receptor Results in Severely Decreased Body Weights, Insulin, and Insulin-Like Growth Factor I Levels and Increased Life Span. **Endocrinology**. 144 (9) , 3799–3810, 2003.
- Coward, J.; Ambrosini, G.; Musi, E.; Truman, J.P.; Haimovitz-Friedman, A.; Allegood, J.C.; Wang, E.; Merrill Jr, A.H.; Schwartz, G.K. Safingol (L-threo-sphinganine) induces autophagy in solid tumor cells through inhibition of PKC and the PI3-kinase pathway. **Autophagy**. v. 5(2):184-93, 2009.

- Dauncey, M.J.; Burton, K.A.; White, P.; Harrison, A.P.; Gilmour, R.S.; Duchamp, C.; Cattaneo, D. Nutritional regulation of growth hormone receptor gene expression. **The FASEB Journal**. vol. 8 no. 1 , 81-88, 1994.
- Duan, C. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. **J. Nutr.** 128, 306S–314S, 1998.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. **The EFSA Journal**. 235 , 1 – 32, 2005.
- Gatford, K.L.; Fletcher, T.P.; Clarke, I.J.; Owens, P.C.; Quinn, K.J.; Walton, P.E.; Grant, P.A.; Hosking, B.J.; Egan, A.R.; Ponnampalam, E.N. Sexual dimorphism of circulating somatotropin, insulin-like growth factor I and II, insulin-like growth factor binding proteins, and insulin: relationships to growth rate and carcass characteristics in growing lambs. **J Anim Sci**. 74(6) , 1314-1325, 1996.
- Gelderblom, W.C.A.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W.F.O.; Thiel, P.G.; Horak, R.M.; Vlegaar, R.; Kriek, N.P.J. Fumonisins-Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied And Environmental Microbiology**. 54 (7), p. 1806-1811, 1988.
- Gopee, N.V.; Sharma, R.P. Selective and transient activation of protein kinase C alpha by fumonisin B1, a ceramide synthase inhibitor mycotoxin, in cultured porcine renal cells. **Life Sci**. v6; 74(12):1541-59, 2004.
- Gopee, N.V.; Sharma, R.P. Sphingoid bases and their phosphates: transient activation and delayed repression of protein kinase C isoforms and their possible involvement in fumonisin B1 cytotoxicity. **Toxicology**. May 3;187(2-3):239-50, 2003.
- Jiang, H.; Lucy, M.C. Involvement of hepatocyte nuclear factor-4 in the expression of the growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in bovine liver. **Mol Endocrinol**. 15(6) , 1023-1034, 2001.
- 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.
- Lazzari, F.A. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. Curitiba 2ª ed., **Paranaset**. 134p, 1997.

- Ledoux, D.R.; Brown, T.; Weibking, T.S.; Rottinghaus, G.E. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **J. Vet.Diagn. Invest.** 4(3) , 330–333, 1992.
- Lee, S.; Barton, E.R.; Sweeney, H.L.; Farrar, R.P. Viral expression of insulin-like growth factor-I enhances muscle hypertrophy in resistance-trained rats. **J. Appl. Physiol.** 96, 1097-1104, 2004.
- LumLertdacha, S.; Lovell, R.T.; Shelbyb, R.A.; Lenz', S.D.; Kemppainen, B.W. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture** 130, 201-218, 1995.
- Mathews, L.S.; Hammer, R.E.; Behringer, R.R.; D'Ercole, A.J.; Bell, G.I.; Brinster, R.L.; Palmiter, R.D. Growth enhancement of transgenic mice expressing human insulin-like growth factor I. **Endocrinology** . 123(6), 2827-2833, 1988.
- Pepeljnjak, S.; Petrincec, Z.; Kovacic, S.; Segvic, M. Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio L.*) on feed amended with fumonisin B1. **Mycopathologia** 156: 139–145, 2002
- Pérez-Sánchez, J.; Le Bail, P.Y. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. **Aquaculture.** 177(1–4) , 117–128, 1999.
- Petrincec, Z.; Pepeljnjak, S.; Kovacic, S.; Krznaric, A. Fumonisin B1 causes multiple lesions in common carp (*Cyprinus carpio*). **Dtsch Tierarztl Wochenschr.** 111(9), 358-63, 2004.
- Riley, R.T.; Enongene, E.; Voss, K.A.; Norred, W.P.; Meredith, F.I.; Sharma, R.P.; Spitsbergen, J.; Williams, D.E.; Carlson, D.B.; Merrill Jr, A.H. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environ Health Perspect.** 109(2), 301-8, 2001.
- 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. **Toxicol Sci.** 92(1), 335-45, 2006.
- Rui, L.; Archer, S.F.; Argetsinger, L.S.; Carter-Su, C. Platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid inhibit growth hormone binding and signaling via a protein kinase C-dependent pathway. **J Biol Chem.** v.28;275(4):2885-92, 2000.
- Slifierz, M.J.; Friendship, R.; Lange, C.F.; Rudar, M.; Farzan, A. An epidemiological investigation into the association between biomarkers and growth performance in nursery pigs. **BMC Vet Res.** 247 , 1-9, 2013.
- Statistical Analyses System - SAS. **SAS/STAT** 2000: version 8. Cary: 2000.

- Stewart, C.E.; Newcomb, P.V.; Savage, P.B.; Dickens, M.; Tavaré, J.; Holly, J.M. Increased, not decreased activation of the insulin-like growth factor (IGF) receptor signalling pathway during ceramide-induced apoptosis. **Growth Horm IGF Res.** v.9(2):131-42, 1999.
- Stick, D.A.; Davis, M.E.; Loerch, S.C.; Simmen, R.C. Relationship between blood serum insulin-like growth factor I concentration and postweaning feed efficiency of crossbred cattle at three levels of dietary intake. **J. Anim. Sci.** 76: 498-505, 1998.
- Stockmann-Juvala, H.; Alenius, H.; Savolainen, K. Effects of fumonisin B(1) on the expression of cytokines and chemokines in human dendritic cells. **Food Chem Toxicol.** 46(5) , 1444-51, 2008.
- Suttie, J.M.; White, R.G.; Breier, B.H.; Gluckman, P.D. Photoperiod associated changes in insulin-like growth factor-I in reindeer. **Endocrinology.** 129(2):679-82, 1991.
- 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. 217 515-528, 2003.
- 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):14486-90, 1991.
- Weibking, T. S.; Ledoux, D. R.; Bermudez, A. J.; Turk, J. R.; Rottinghaus, G. E. Effects of Feeding *Fusarium moniliforme* Culture Material, Containing Known Levels of Fumonisin B1, on the Young Broiler Chick. **Poultry Science**, v.72 (3): 456-466, 1993.
- Weller, P.A.; Dauncey, M.J.; Bates, P.C.; Brameld, J.M.; Buttery, P.J.; Gilmour, R.S. Regulation of porcine insulin-like growth factor I and growth hormone receptor mRNA expression by energy status. **Am J Physiol.** 266(5) , 776-85, 1994.
- 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, 183–192, 2013.

CAPÍTULO IV

Ação das fumonisinas B1 + B2 sobre a expressão de genes relacionados ao equilíbrio apoptótico em alevinos de tilápia-do-Nilo

Ação das fumonisinas B1 + B2 sobre a expressão de genes relacionados ao equilíbrio apoptótico em alevinos de tilápia-do-Nilo

Resumo - Neste estudo, a hipótese de que a ingestão de dieta contendo fumonisina afeta o equilíbrio apoptótico em células hepáticas foi testada. Desta forma, foi realizado um ensaio mantendo alevinos de tilápia-do-Nilo ($2,64 \pm 0,06g$) alimentados com dietas contendo níveis crescentes de fumonisina (0 mg/kg – dieta controle, 20mg/kg, 40mg/kg e 60mg/kg) e avaliadas a expressão dos genes caspase 7 (CASP 7) e esfingosina fosfato liase (SPL) em tecido hepático, aos 15 e 30 dias de consumo da ração. Também foi avaliada a relação mRNA SPL:CASP 7. Houve redução dos níveis relativos de mRNA de SPL para tilápias tratadas com 60mg FB/kg de ração aos 15 dias ($P < 0,0001$) e aumento significativo de SPL para os dois maiores níveis de inclusão aos 30 dias ($P < 0,0001$). A expressão gênica para CASP 7 foi linearmente reduzida em função do aumento de inclusão de fumonisina aos 15 dias ($P < 0,0001$). Já aos 30 dias, houve redução dos níveis relativos de mRNA de CASP 7 apenas para tilápias tratadas com 60mg FB/kg de ração ($P = 0,0011$). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem uma relação direta entre a expressão da SPL e CASP 7, sendo possível inferir que, quanto maior o tempo de consumo e o nível de fumonisina, maior será a relação numérica entre o mRNA SPL:CASP 7.

Termos para indexação: expressão gênica, desempenho, *Fusarium*, *Oreochromis niloticus*

Fumonisin action on expression of genes related to apoptotic balance of the Nile tilapia fingerlings

Abstract - In this study, the hypothesis that fumonisin affects the apoptotic balance was tested. Thus, Nile tilapia fingerlings ($2.64 \pm 0.06g$) were fed with diets containing different levels of fumonisin (0 mg / kg - control diet, 20mg / kg, 40mg / kg and 60mg / kg), and gene expression of caspase 7 (CASP 7) and sphingosine phosphate lyase (SPL) in hepatic tissue, at 15 and 30 days of consumption were evaluated. We also evaluated the relationship mRNA SPL: CASP 7. Reduction of the relative levels of mRNA for SPL was observed at tilapias treated with FB 60mg / kg for 15 days ($P < 0.0001$), however, there was increase of SPL after 30 days ($P < 0.0001$). Gene expression of CASP 7 was linearly reduced due to the increase of inclusion of fumonisin at 15 days ($P < 0.0001$). At 30 days, there was a reduction of the relative levels of mRNA CASP 7 only for tilapia treated with 60mg FB / kg ($P = 0.0011$). Our results showed a direct relation between the expression of SPL and CASP 7. It is possible to infer that the greater time and levels of fumonisin, bigger will be the numerical relationship between the mRNA SPL and 7 CASP.

Index terms: gene expression, performance, mycotoxin, *Oreochromis niloticus*

Introdução

As fumonisinas são micotoxinas produzidas durante o metabolismo secundário dos fungos *Fusarium verticillioides* e *F. Proliferatum* (Turner et al., 1999). A presença de fumonisina nas rações é relativamente comum, dado que o milho, fonte natural de contaminação por fumonisina, é comumente utilizado como fonte energética (Griessler & Encarnação, 2009). Em peixes, sabe-se que diferentes níveis de fumonisina podem reduzir o ganho em peso (LumLertdacha et al., 1995; Pepeljnjak et al., 2002; Tuan et al., 2003; Gbore et al., 2010), causar alterações hematológicas (Pepeljnjak et al., 2002; Gbore et al., 2010), neurotoxicidade (Kovačić et al., 2009) e aumentar relação entre esfinganina (Sa)/esfingosina (So) (Goel et al., 1994).

O mecanismo exato de ação das fumonisinas ainda não é totalmente conhecido, entretanto, existem evidências que apontam a perturbação do equilíbrio das concentrações de esfingolipídios como responsável por grande parte dos danos. A teoria mais aceita de ação das fumonisinas é que esta micotoxina compete com as bases esfingóides, esfinganina e esfingosina pelo sítio de ligação na enzima ceramida sintase promovendo redução nas concentrações relativas de ceramida, aumento das bases esfingóides livres (Sa e So) e, posteriormente, de esfingosina 1- fosfato (S1P) (Wang et al., 1991; Yoo et al., 1992).

O desequilíbrio entre as concentrações destas bases é apontado como principal responsável pelo efeito hepatotóxico das fumonisinas, e podem estar associadas a alterações dos níveis de caspases, enzimas envolvidas no desencadeamento da cascata de eventos apoptóticos. O papel de fumonisinas sobre o equilíbrio apoptótico foi relatado de maneira contraditória como pró apoptótico (Wang et al., 1996; Jones et al., 2001; Ribeiro et al., 2010) e anti apoptótico (Bose et al., 1995, Mullen et al., 2012; Boppana et al., 2014). Em alguns casos, fumonisinas são apontadas como indutores de resistência à morte celular mesmo após células serem submetidas a fatores de estresse, representando um risco ao organismo (Biswal et al., 2000; Ueda et al., 2001; Sauane et al., 2010; Mullen et al., 2011).

A apoptose é uma resposta fisiológica de extrema importância, pois permite que células danificadas sejam eliminadas mantendo a homeostase celular. Em células tumorais, por exemplo, alterações na expressão de genes relacionados a vias de sinalização de apoptose são frequentemente observadas, resultando em redução nas taxas de morte celular (Bargou et al., 1996; Pflaum et al., 2014). As cascatas de sinalização que resultam na apoptose são tão elaboradas quanto aquelas que promovem

a sobrevivência celular, e a ação coordenada entre ambas é essencial para a execução correta das funções celulares. Neste contexto, importância significativa é dada aos esfingolipídios uma vez que alguns de seus produtos intermediários desempenham papéis essenciais na sinalização tanto da morte quanto da sobrevivência celular (Huang et al., 2011).

A super expressão de genes pró apoptóticos e o silenciamento de genes anti apoptóticos estão sob investigação para o tratamento de câncer a fim de induzir células tumorais à apoptose (Mohammed et al., 2011; Pavan et al., 2013). Estudos sugerem que maior expressão da enzima esfingosina fosfato liase (SPL) (Min et al., 2004 e 2005; Brizuela et al., 2012), bem como terapia com ceramida pode auxiliar na indução de apoptose em linhagens de células tumorais por meio da ruptura da sinalização de S1P e ativação de caspases ceramida dependente (Brizuela et al., 2012; Aureli et al., 2014).

A resposta fisiológica à fumonisinas envolve metabólitos intermediários de esfingolipídios diretamente relacionados ao equilíbrio apoptótico e parecem ser dependentes do nível e do tempo de exposição à micotoxina (Yoo et al., 1992). É possível que diferentes níveis de fumonisina afetem distintamente a expressão de caspases, por meio da redução da concentração de ceramidas, e aumento da expressão gênica da enzima SPL, devido a maiores concentrações de S1P decorrente do acúmulo de esfingosina.

Em peixes, entretanto, não há relatos na literatura da ação de fumonisina sobre a expressão de genes relacionados ao equilíbrio apoptótico, como caspase e SPL. Neste estudo, foi testada a hipótese de que a ingestão de dieta contendo níveis crescentes da micotoxina fumonisina afeta a expressão de genes relacionados ao equilíbrio apoptótico em função do tempo de consumo. Desta forma, foi realizado um ensaio mantendo alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados com dietas contendo diferentes níveis de fumonisina e avaliadas a expressão dos genes caspase 7 (CASP 7) e esfingosina fosfato liase (SPL) em tecido hepático, aos 15 e 30 dias de consumo da ração.

Material e métodos

Os procedimentos neste experimento foram realizados de acordo com regulamento da comissão de ética no uso de animais (CEUA - UniCesumar).

Delineamento Experimental e Animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá - UEM, durante o mês de outubro de 2014. Foram utilizados 180 alevinos de tilápia-do-Nilo, revertidos sexualmente para macho, pertencentes ao grupo genético GIFT x Tailandesa, com peso inicial de $2,64 \pm 0,06$ g. Foram utilizadas 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 acopladas quatro hapas totalizando 12 unidades experimentais com quatro tratamentos e três repetições. Cada hapa possuía um volume individual de 217,50L onde foram alojados 15 peixes, totalizando 14,5 L/peixe. Os peixes passaram por um período de adaptação de 15 dias antes do início do experimento.

Variáveis físicas e químicas da água

A temperatura foi aferida duas vezes ao dia em cada tanque, às 9:00 e 17:00 horas, já o oxigênio dissolvido e o pH foram aferidos pela manhã durante todo o período experimental, por meio de kit individual colorimétrico.

Dietas experimentais

As fumonisinas B1 + B2 foram adquiridas em forma de meio de cultura, por intermédio do laboratório de análises micotoxicológicas – LAMIC, da Universidade Federal de Santa Maria - UFMS. As dietas foram elaboradas considerando a concentração de FB1 + FB2 indicadas em laudo fornecido pelo LAMIC, totalizando uma concentração de 7,41mg de fumonisina/g de meio de cultura (6,06mg de FB1 + 1,35mg FB2/g de meio).

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, divididos nos seguintes grupos: 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 FB/kg e GRUPO 4 - 60 mg de inclusão de FB/kg (Tabela 1).

As dietas foram peletizadas, secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 48 horas, desintegradas em moedor manual e as partículas classificadas de acordo com a granulometria (1 a 2mm). Após prontas, as dietas foram novamente avaliadas para a

confirmação dos níveis de fumonisinas adicionados. A composição química das dietas foi avaliada de acordo com protocolos descritos por Silva & Queiroz, 2006.

As dietas foram fornecidas manualmente aos peixes, três vezes/dia, até saciedade aparente dos peixes.

Tabela 1- Composição percentual e química das dietas experimentais

<i>Ingredientes (%)</i>	<i>Dietas experimentais</i>			
	<i>Controle</i>	<i>20mg FB/kg</i>	<i>40mg FB/kg</i>	<i>60mg FB/kg</i>
Farelo de soja	53,7	53,7	53,7	53,7
Milho	31,0	31,0	31,0	31,0
Glúten de milho 60	8,2	8,2	8,2	8,2
Óleo de soja	2,0	2,0	2,0	2,0
Amido de milho	1,0	1,0	1,0	1,0
DL-metionina	0,01	0,01	0,01	0,01
Calcário calcítico	0,1	0,1	0,1	0,1
Fosfato bicálcico	2,9	2,9	2,9	2,9
Vitamina C ¹	0,06	0,06	0,06	0,06
Suplemento vitamínico e mineral ²	0,5	0,5	0,5	0,5
Sal comum	0,5	0,5	0,5	0,5
BHT (antioxidante) ³	0,03	0,03	0,03	0,03
Fumonisina B1+B2	-	0,002	0,004	0,006
TOTAL	100	100	100	100
<i>Composição química avaliada da dieta (%)⁴</i>				
Proteína bruta	33,62	33,60	33,61	33,61
Matéria seca	89,52	89,51	89,50	89,52
Gordura	4,33	4,33	4,30	4,29
Matéria mineral	5,79	5,75	5,76	5,78

¹ Vitamina C: sal cálcica 2-monofosfato de ácido ascórbico, 42% de princípio ativo;

² Suplemento mineral e vitamínico: Composição/kg de produto: Vit. A=1.200.000 UI; vit. D3=200.000 UI; vit. E=12.000 mg; vit. K3=2.400 mg; vit. B1=4.800 mg; vit. B2=4.800 mg; vit. B6=4.000 mg; vit. B12=4.800 mg; ác. fólico=1.200 mg; pantotenato de cálcio=12.000 mg; vit. C=48.000 mg; biotina=48 mg; colina=65.000 mg; ácido nicotínico=24.000 mg; Fe=10.000 mg; Cu=600 mg; Mn=4.000 mg; Zn=6.000 mg; I=20 mg; Co=2 mg e Se=20 mg;

³ Butil-Hidroxi-tolueno (Antioxidante);

⁴ Composição com base na matéria natural.

Expressão gênica

Para análise de expressão gênica, o fígado de seis animais de cada tratamento, previamente anestesiados com 90 mg/L de óleo de cravo, foram coletados aos 15 e 30 dias de experimento em RNA Holder (BioAgency Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e armazenados a -80°C até a extração de RNA total.

O RNA total foi extraído 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. O tecido foi pesado, triturado e misturado ao Trizol (1 mL de Trizol por 35 mg de tecido) até completa dissociação. Após esta etapa 200 µL de clorofórmio foram adicionados às amostras, e homogeneizadas manualmente durante um minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 8.000 x g e 4°C formando camadas separadas. Nesta etapa, foram recolhidos 500 µL da fase aquosa e transferidos para um tubo estéril contendo 500 µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas durante 15 minutos a 8.000 x g e 4°C. O sobrenadante foi descartado, e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 75% para limpeza. Os tubos foram novamente centrifugados a 8.000 x g durante cinco minutos, e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi seco por 15 minutos a 4°C e ressuspendido em água ultra pura livre 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 foi utilizado kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen Corporation, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Nesta etapa, foram adicionadas a um tubo estéril livre de RNA 6 µL de RNA total, 1 µL de oligo dT (50 µM de oligo (dT) 20) e 1 µL de tampão de emparelhamento. As amostras foram incubadas durante cinco minutos a 65°C e colocadas imediatamente em gelo durante 1 minuto. Em seguida, 10 µL de 2× First-Strand Reaction Mix e 2 µL de solução contendo a enzima transcriptase reversa SuperScript III foram adicionadas aos tubos. A solução foi incubada durante 50 minutos a 50°C e cinco minutos a 85°C, e imediatamente colocado em gelo. Após esta etapa, as amostras foram armazenadas a

-20°C até a sua utilização. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o corante fluorescente SYBR Green (SYBR® GREEN PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA).

Os *primers* utilizados para avaliação dos genes da caspase 7 (CASP 7) e da esfingosina fosfato liase (SPL) foram desenhados com base nas sequências de genes depositados em www.ncbi.nlm.nih.gov (números de acesso: XM_005471473 e XM_003441226.2 respectivamente) utilizando-se o site www.idtdna.com. Três controles endógenos obtidos de Yang et al. (2013) foram testados: UBCE (enzima conjugadora de ubiquitina - XM_003460024), EF1A (fator de alongação 1 α - 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. Os *primers* utilizados neste experimento encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2- Sequência dos *primers* usados para as reações de PCR em tempo real

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i> (bp)
CASP 7 – F	GATTCCTGTGTGGTCTCTATG	94
CASP 7 – R	GGTCAGTCTGTGGCATCATT	
SPL F	GTCACTGACCAAACCTCCTAGTG	125
SPL R	GACAACCTCTGCTTCCATCTT	
EF1- α – F	GCACGCTCTGCTGGCCTTT	250
EF1- α – R	GCGCTCAATCTTCCATCCC	
UBCE – F	CTCTCAAATCAATGCCACTTCC	130
UBCE – R	CCCTGGTGGAGGTTCTTGT	
B-ACT – F	TGGTGGGTATGGGTCAGAAAG	217
B-ACT – R	TGTTGGCTTTGGGGTTCA	

Todas as reações foram realizadas para um volume final de 12,5 μ L e em duplicatas. A análise das curvas de dissociação não revelou qualquer presença de dímeros de *primers* ou produtos não específicos.

Análise estatística

Para avaliar a expressão relativa, os dados provenientes da análise de PCR em tempo real foram transformados utilizando $2^{-\Delta CT}$, como demonstrado por Livak &

Schmittgen, (2001). Os dados de expressão gênica foram analisados utilizando-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4 (duas idades – 15 e 30 dias, e quatro níveis de inclusão de fumonisina) usando o procedimento GLM e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Os resultados são expressos como médias e desvios-padrão. Os dados de relação entre a expressão de gênica de SPL e CASP7 foram analisados usando o procedimento REG Statement (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA).

Resultados

Os valores médios e desvios padrão da expressão relativa dos genes CASP 7 e SPL no fígado de alevinos de tilápia-do-Nilo em função do nível de inclusão de fumonisina e do tempo de consumo são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Expressão gênica relativa dos genes CASP 7 e SPL aos 15 e 30 dias de consumo de níveis crescentes de fumonisina.

<i>Tratamento</i>	mRNA de CASP ¹		mRNA de SPL	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
Controle	0,023±0,0101	0,0025±0,0004	0,0051±0,0003	0,0015±0,0003
20mg FB /kg	0,011±0,0023	0,0024±0,0006	0,0045±0,0006	0,0013±0,0001
40mg FB /kg	0,004±0,0014	0,0022±0,0001	0,0044±0,0009	0,0034±0,0010
60mg FB /kg	0,001±0,0005	0,0007±0,0001	0,0023±0,0003	0,0023±0,0006

1. UA- unidades arbitrárias

A expressão gênica da enzima SPL foi significativamente alterada pelas dietas. Houve efeito da interação entre o tempo de consumo e os níveis de fumonisina na dieta (Figura 1). Redução dos níveis relativos de mRNA de SPL foi observada apenas para tilápias tratadas com 60mg FB/kg de ração aos 15 dias ($P < 0,0001$) enquanto que aos 30 dias, houve aumento significativo de SPL para os dois maiores níveis de inclusão ($P < 0,0001$).

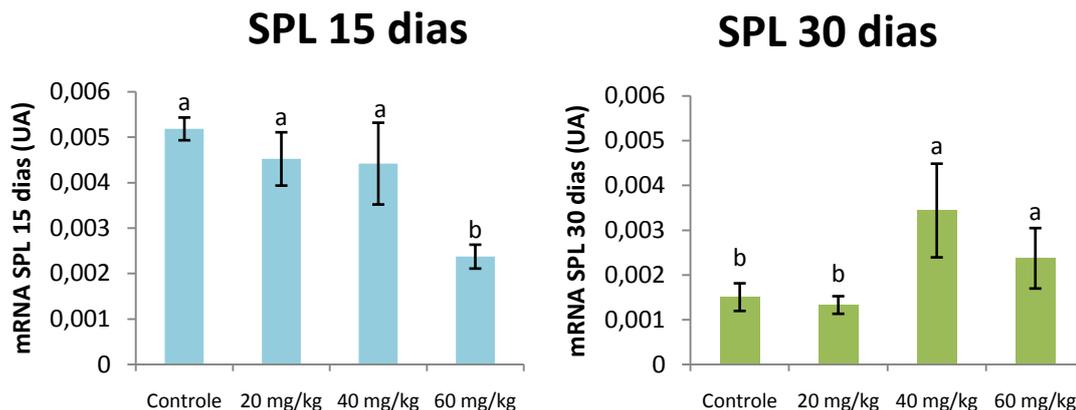


Figura 1. Efeito do tempo de consumo e dos níveis de inclusão de fumonisinas nas dietas sobre a expressão gênica de SPL. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Letras minúsculas sobre as barras comparam as médias entre os períodos dentro do mesmo tratamento. Teste de Tukey para 5% de probabilidade.

A expressão gênica para CASP 7 também foi significativamente alterada pelas fumonisinas, com efeito significativo de interação entre o tempo de consumo e os níveis de fumonissina na dieta (Figura 2). Observou-se aos 15 dias de tratamento que a inclusão de níveis crescentes de fumonissina na dieta reduz linearmente os valores relativos de mRNA de CASP 7 ($P < 0,0001$). Já aos 30 dias, houve redução dos níveis relativos de mRNA de CASP 7 apenas para tilápias tratadas com 60mg FB/kg de ração ($P = 0,0011$).

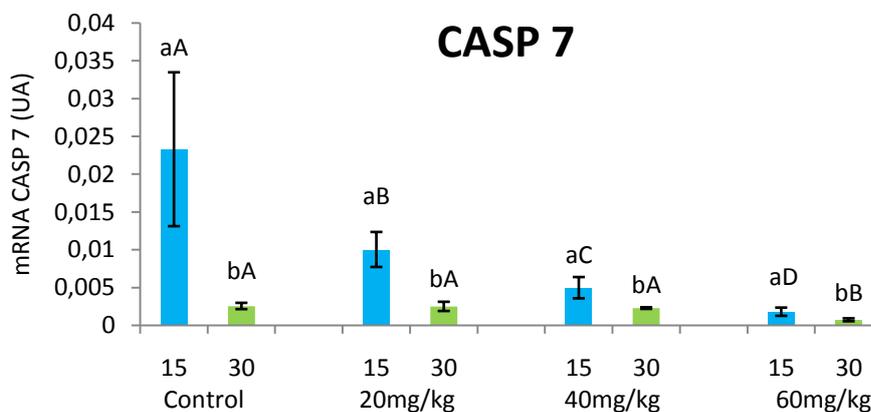


Figura 2. Efeitos do tempo de consumo e dos níveis de inclusão de fumonissina sobre a expressão gênica de CASP 7. Valores expressos em unidades arbitrárias (UA). Letras minúsculas sobre as barras comparam as médias entre os períodos dentro do mesmo tratamento. Letras maiúsculas sobre as barras representam teste de média entre os níveis dentro do mesmo período. Teste de Tukey para 5% de probabilidade.

Os maiores valores de mRNA de Casp 7, em relação a SPL foram observadas para o tratamento controle, tanto aos 15, quanto aos 30 dias. Paradoxalmente, os níveis

de mRNA de SPL foram maiores que de CASP 7 para os dois maiores níveis de inclusão de fumonisina testados, como demonstrado na Figura 3.

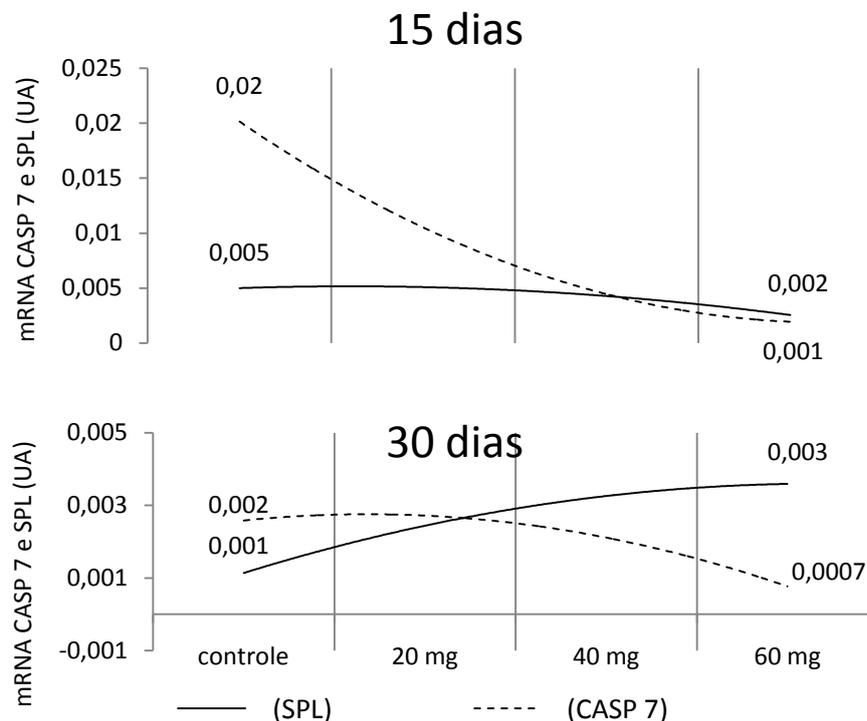


Figura 3. Comparação entre o padrão de expressão de mRNA de SPL e CASP 7 aos 15 e 30 dias de tratamento.

Quando avaliada a relação numérica entre as expressões relativas de SPL e CASP 7 observou-se uma forte tendência ao aumento desta relação em função do tempo e dos níveis de inclusão de fumonisina (Figura 4).

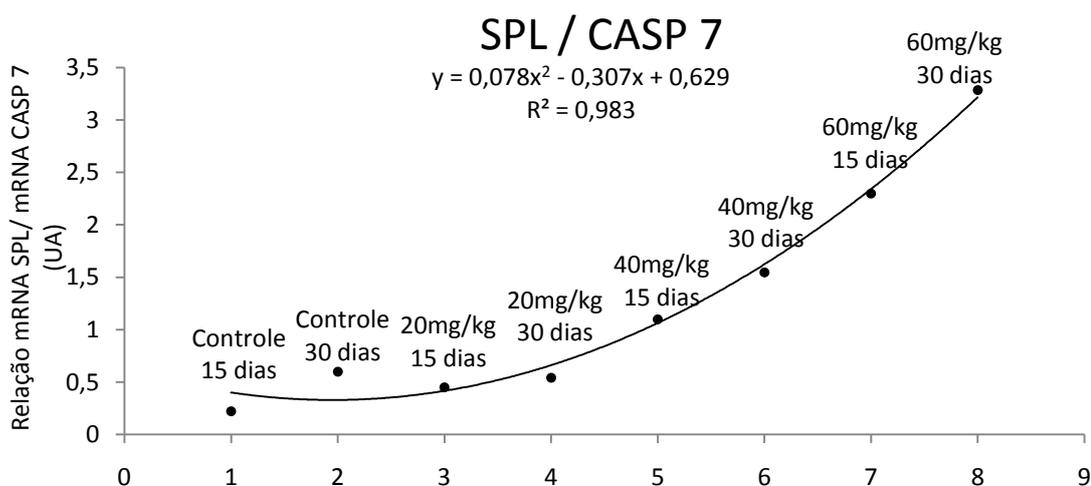


Figura 4. Relação numérica entre os valores de mRNA de SPL e CASP 7 no fígado de tilápia-do-Nilo desafiadas por 15 e 30 dias com níveis crescentes de fumonisina B1 + B2.

Discussão

A apoptose é fundamental para que células danificadas sejam eliminadas. Neste contexto, existe uma questão fundamental envolvendo o metabolismo dos esfingolipídios (Soriano et al., 2005) onde o desequilíbrio entre os metabólitos desta rota podem mudar o destino de uma célula, e levar a respostas negativas significativas como, por exemplo, a carcinogênese (Desai et al., 2002).

A estabilidade entre os níveis de ceramida, bases esfingóides e S1P está diretamente associada ao equilíbrio apoptótico celular. Fumonisinias causam acúmulo de esfinganina na célula, pois inibe a ceramida sintase, única enzima capaz de catalisar esfinganina à ceramida. Excesso de esfinganina e esfingosina pode ser minimizado por meio de sua bioconversão para S1P (Riley & Voss, 2006). Esta bioconversão, entretanto, pode causar a quebra do equilíbrio apoptótico por gerar grandes concentrações de S1P, capaz de promover proliferação e sobrevivência celular através da inibição da apoptose (Taha et al., 2006). Desta forma, é provável que fumonisinias causem redução de ceramida, acúmulo de esfinganina e elevada produção de S1P alterando o equilíbrio apoptótico.

Em condições normais, a homeostase entre esfingosina, esfinganina e S1P é estreitamente regulado pela atividade de diversas enzimas-chave, como esfingosina quinase (SPK), esfingosina 1 fosfato fosfatase (S1PP) e esfingosina fosfato liase (SPL). A esfingosina é fosforilada pela SPK para formar S1P. Nesta etapa, S1P pode ser revertida à esfingosina pela S1PP, ou ainda gerar irreversivelmente fosfoetanolamina e hexadecenal por meio da ação da SPL (Taha et al., 2006). A função da fosfoetanolamina ainda não é bem conhecida, entretanto acredita-se que os produtos gerados pela SPL podem estar relacionados ao aumento de apoptose por uma via de sinalização independente da caspase-3 (Ferreira et al., 2013).

Neste trabalho, a expressão gênica da enzima SPL e caspase 7 (CASP 7) foi avaliada. Para SPL, foi verificado efeito da interação entre as concentrações de fumonisinina e dias de exposição à toxina ($P < 0,0001$) sugerindo que os efeitos de fumonisinina são dose - tempo dependente. Aos 15 dias, os diferentes níveis de fumonisinina afetaram a expressão do mRNA da SPL ($P = 0,0002$) com leve redução de expressão para os animais que consumiram o maior nível de inclusão. Entretanto, para animais alimentados por 30 dias, verificou-se aumento significativo da expressão da SPL para os dois maiores níveis de inclusão testados ($P < 0,0001$) (Figura 1).

Os níveis de S1P nas células são fortemente regulados pelo balanço entre sua síntese e degradação. É possível que o comportamento da expressão gênica da enzima SPL aos 15 dias seja decorrente da ativação de mecanismo de compensação, onde a enzima Sa/So 1 fosfato fosfatase (S1PP), que catalisa a volta da esfingosina 1-fosfato para esfingosina, tenha evitado o acúmulo de S1P, principalmente para o maior nível de inclusão de fumonisina, numa tentativa sem sucesso de formar ceramida via ceramida sintase.

Já 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 Loetscher et al. (2013). De acordo com Wang et al. (1992), 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. Acredita-se que a SPL tem a capacidade de alterar o equilíbrio celular pela ação direta sobre os níveis de S1P, envolvendo as rotas de sinalização p53 e p38MAPK, os quais estão associados à sinalização de morte celular envolvendo as caspases (Giovannini et al., 2011).

Alguns estudos têm apontado fumonisinas como estimuladores de apoptose via caspase (Seefelder et al., 2003; Gopee & Sharma, 2004; Kim et al., 2007), entretanto, os dados obtidos neste trabalho sugerem uma resposta diferente. Peixes submetidos às doses crescentes de fumonisina durante 15 dias apresentaram redução acentuada de mRNA de CASP 7 (aproximadamente 23 vezes). Aos 30 dias de tratamento, a redução na expressão de CASP 7 também foi observada porém, de forma mais branda

(aproximadamente 3,5 vezes) (Tabela 3). De modo geral, os dados demonstram que a inclusão de níveis crescentes de fumonisina reduzem a expressão de gênica para caspase 7 no fígado de tilápia-do-Nilo. Semelhantemente ao encontrado por nós, Mullen et al. (2012) observaram que a inibição da ceramida sintase por fumonisinas também inibiu a ativação das caspases 3 e 7, com subsequente redução da apoptose, sugerindo que as funções de ceramida afetam diretamente a ativação de caspase por influenciar a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, impedindo a mobilização dos fatores responsáveis pelo início da cascata de caspases.

Em células sob condições normais, após receber estímulos genotóxicos ocorre um acúmulo de ceramida intracelular que atua diretamente sobre a proteína fosfatase 2 (PP2A) (Bionda et al., 2004; Xin & Deng, 2006). Esta fosfatase juntamente com a quinase anti apoptótica Akt / PKB regulam a ação dos fatores anti apoptóticos Bax / Bcl-2 promovendo permeabilidade mitocondrial (Taha et al., 2006). Subsequentemente, a proteína "Smac / DIABLO" e citocromo c são liberadas da mitocôndria, promovendo a ativação da cascata de caspases por meio da proteína adaptadora Apaf-1 (Du et al., 2000). Boppana et al. (2014) demonstraram em sua pesquisa que fumonisinas exercem papel anti apoptótico por inibir o acúmulo de ceramida no retículo endoplasmático, a translocação de Bax para a mitocôndria e a liberação de citocromo C.

Neste contexto, menores concentrações de ceramida decorrentes do consumo de fumonisinas podem ser responsáveis pela menor expressão de CASP 7 e, conseqüentemente, redução das taxas de apoptose caspase dependentes. Quando concomitantemente avaliadas as expressões de SPL e CASP 7 para os níveis de inclusão propostos, foi possível observar a formação de um padrão de expressão gênica, sendo que, para o tratamento controle, os níveis de CASP 7 são maiores que de SPL e ao maior nível de inclusão de fumonisinas nas dietas este padrão se inverte, sendo a expressão de SPL maior que de CASP 7 (Figura 3). A inversão da expressão destes genes foi mais acentuada aos 30 dias. Kim et al. (2007) também observaram um padrão invertido de expressão para SPL e caspase 3 no fígado de ratos expostos à fumonisina por 5 dias, entretanto, menor expressão de caspase e maior expressão de SPL foram observados para os animais submetidos ao tratamento controle.

Neste trabalho, o padrão inverso de expressão de CASP 7 e SPL em função dos níveis de fumonisina foram observados, e por este motivo, o comportamento da relação entre estes genes também foi avaliada. Quando analisada a relação entre os níveis de SPL e CASP 7, é possível observar tendência de aumento desta relação em resposta aos

crecentes níveis de fumonisina nas dietas (Figura 4). Desta forma, é possível supor que os mecanismos envolvidos no aumento da expressão de SPL também estão relacionados à redução da expressão da CASP 7, quando os animais estão consumindo um supressor de ceramida.

De modo geral, nossos resultados indicam alterações na expressão da SPL para alevinos de tilápias consumindo doses crescentes de fumonisina na ração e que os efeitos são dose e tempo dependentes. É provável que a redução nos níveis de mRNA CASP 7 observados seja dependente de uma redução dos níveis de ceramida (Reiss et al., 2004), que provavelmente foram alterados pela ação da fumonisina. Já o aumento de SPL provavelmente seja resultado do aumento das bases esfingóides, e conseqüentemente de S1P. Estes resultados mostraram uma relação direta entre a expressão da SPL e CASP 7, sendo possível inferir que quanto maior o tempo de consumo e o nível de fumonisina, maior será a relação numérica entre a expressão gênica de SPL e CASP 7.

Conclusão

1. A ingestão de dietas contendo níveis crescentes de fumonisinas B1 + B2 afetam a expressão de genes relacionados ao equilíbrio apoptótico, CASP 7 e SPL, em função dos tempos de consumo avaliados.

Referências

- Aureli, M.; Murdica, V.; Loberto, N.; Samarani, M.; Prinetti, A.; Bassi, R.; Sonnino, S. Exploring the link between ceramide and ionizing radiation. **Glycoconj J.**, 31(6-7) 449-59, 2014.
- Bargou, R.C.; Wagener, C.; Bommert, K.; Arnold, W.; Daniel, P.T.; Mapara, M.Y.; Grinstein, E.; Royer H.D.; Dörken B. Blocking the transcription factor E2F/DP by dominant-negative mutants in a normal breast epithelial cell line efficiently inhibits apoptosis and induces tumor growth in SCID mice. **J Exp Med.**, 1;183(3):1205-13, 1996.
- Bionda, C.; Portoukalian, J.; Schmitt, D.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Ardail D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria?. **Biochem J.**, 382:527–33, 2004.
- Biswal, S.S.; Datta, k.; Acquaah-Mensahg, K.; Kehrerj, P. Changes in ceramide and sphingomyelin following fludarabine treatment of human chronic B-cell leukemia cells, **Toxicology**, 154, 45–53, 2000.
- Boppana, N.B.; Kodiha, M.; Stochaj, U.; Lin, H.S.; Haimovitz-Friedman, A.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Divine, G.W.; Boyd, J.A.; Korbelik, M.; Separovic, D. Ceramide synthase inhibitor fumonisin B1 inhibits apoptotic cell death in SCC17B human head and neck squamous carcinoma cells after Pc4 photosensitization. **Photochem Photobiol Sci.** v.15;13(11):1621-7, 2014.
- Bose, R.; Verheij, M.; Haimovitz-Friedman, A.; Scotto, K.; Fuks, Z.; Kolesnick, R. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. **Cell.** v.82:405-414, 1995.
- Brizuela, L.; Ader, I.; Mazerolles, C.; Bocquet, M.; Malavaud, B.; Cuvillier, O. First evidence of sphingosine 1-phosphate lyase protein expression and activity downregulation in human neoplasm: implication for resistance to therapeutics in prostate cancer. **Mol Cancer Ther.**, 11(9):1841-51, 2012.
- Desai, K.; Sullards, M.C.; Allegood, J.; Wang, E.; Schmelz, E.M.; Hart, M.; Humpf, H.U.; Liotta, D.C.; Peng, Q.; Merrill Jr., A.H. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1585; 188- 192, 2002.
- Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, 102:33-42, 2000.

- Ferreira, A.K.; Meneguelo, R.; Pereira A.; Filho, O.M.; Chierice, G.O.; Maria, D.A. Synthetic phosphoethanolamine induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through the mitochondrial pathway. **Biomed Pharmacother.**, 67(6):481-7, 2013.
- Gbore, F.A.; Adewole, A.M.; Oginni, O.; Oguntolu, M.F.; Bada, A.M.; Akele, O. Growth performance, haematology and serum biochemistry of African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings fed graded levels of dietary fumonisin B1. **Mycotoxin Res.**, 26(4):221-7, 2010.
- Giovannini, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Sanchez, M.; Santangelo, C.; Filesi, C.; D'archivio, M.; Masella, R. OxLDL induced p53-dependent apoptosis by activating p38MAPK and PKC β signaling pathways in J774A.1 macrophage cells. **J Mol Cell Biol.**, 3(5):316-8, 2011.
- Goel, S.; Lens S.D.; LumLertdacha, S.; Lovell, R.T.; Shelby, R.A.; Li M.; Riley, R.T.; Kemppainen, B.W. Sphingolipid levels in catfish consuming *F. moniliforme* corn culture material with fumonisins. **Aquatic Toxicology**, 30, 285-294, 1994.
- Gopee, N.V.; Sharma, R.P. The mycotoxin fumonisin B1 transiently activates nuclear factor-kappaB, tumor necrosis factor alpha and caspase 3 via protein kinase C α -dependent pathway in porcine renal epithelial cells. **Cell Biol Toxicol.**, 20(4):197-212, 2004.
- Griessler, K.; Encarnação, P. Fumonisin - mycotoxins of increasing importance in fish. **Aquacult Asia Magazine**, XIV (2): 24-26, 2009.
- Huang, Y.L.; Huang, W.P.; Lee, H. Roles of sphingosine 1-phosphate on tumorigenesis. **World J Biol Chem.** 26; 2(2): 25-34, 2011.
- Jones, C.; Ciacci-Zanella, J.R.; Zhang, Y.; Henderson, G.; Dickman, M. Analysis of fumonisin B1-induced apoptosis. **Environ Health Perspect.**, 109(2): 315-320, 2001.
- Kim, D.H.; Lee, Y.S.; Lee, Y.M.; Oh, S.; Yun, Y.P.; Yoo, W.S. Elevation of Sphingoid Base 1-Phosphate as a Potential Contributor to Hepatotoxicity in Fumonisin B1-Exposed Mice. **Arch Pharm Res.**, 30 (8), 962-969, 2007.
- Kovačić, S.; Pepeljnjak, S.; Petrincec, Z.; Klarić, M.S. Fumonisin B1 neurotoxicity in young carp (*Cyprinus carpio l.*). **Arh Hig Rada Toksikol**; 60:419-426, 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(4):402-8, 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.**, 12;433(3):345-8, 2013.
- LumLertdacha, S.; Lovell, R.T.; Shelby, R.A.; Lenz', S.D.; Kemppainen, B.W. Growth, hematology, and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture** 130, 201-218, 1995.
- Min, J.; Stegner, A.; Alexander, H.; Alexander, S. Overexpression of sphingosine-1-phosphate lyase or inhibition of sphingosine kinase in *Dictyostelium discoideum* results in a selective increase in sensitivity to platinum-based chemotherapy drugs. **Eukaryot Cell**, 3(3):795–805, 2004.
- Min, J.; Van Veldhoven, P.P.; Zhang, L.; Hanigan, M.H.; Alexander, H.; Alexander, S. Sphingosine-1-phosphate lyase regulates sensitivity of human cells to select chemotherapy drugs in a p38-dependent manner. **Mol Cancer Res.**, 3(5):287–96, 2005.
- Mohammed, K.A.; Wang, X.; Goldberg, E.P.; Antony, V.B.; Nasreen, N. Silencing receptor EphA2 induces apoptosis and attenuates tumor growth in malignant mesothelioma. **Am J Cancer Res.**, 1(3):419-431, 2011.
- Mullen, T.D.; Hannun, A.; Obeidl, M. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. **Biochem J.**, 441(3): 789–802, 2012
- Mullen, T.D.; Jenkins, R.W.; Clarke, C.J.; Bielawski, J.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Ceramide synthase-dependent ceramide generation and programmed cell death: involvement of salvage pathway in regulating postmitochondrial events. **J. Biol. Chem.**, 286, 15929-15942, 2011.
- Pavan, S.; Olivero, M.; Corà, D.; Di Renzo, M.F. IRF-1 expression is induced by cisplatin in ovarian cancer cells and limits drug effectiveness. **Eur J Cancer.**, 49(4):964-73, 2013.
- Pepeljnjak, S.; Petrincic, S.; Kovacic, S.; Segvic, M. Screening toxicity study in young carp (*Cyprinus carpio* L.) on feed amended with fumonisin B1. **Mycopathologia** 156: 139–145, 2002
- Pflaum, J.; Schlosser, S.; Müller, M. p53 family and cellular stress responses in cancer. **Front Oncol.**, 4: 285, 2014.
- Reiss, U.; Oskouian, B.; Zhou, J.; Gupta, V.; Sooriyakumaran, P.; Kelly, S.; Wang E.; Merrill Jr., A.H.; Saba, J.D. Sphingosine-phosphate Lyase Enhances Stress-

- induced Ceramide Generation and Apoptosis. **The Journal Of Biological Chemistry**, 279 (2), pp. 1281-1290, 2004.
- Ribeiro, D.H.B.; Ferreira, F.L.; da Silva, V.N.; Aquino, S.; and Corrêa, B. Effects of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 on the Viability and Induction of Apoptosis in Rat Primary Hepatocytes. **Int J Mol Sci.**, 11(4): 1944-1955, 2010.
- 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**, 92(1), 335-345, 2006.
- Sauane, M.; Su, Z.Z.; Dash, R.; Liu, X.; Norris, J.S.; Sarkar, D.; Lee, S.G.; Allegood, J.C.; Dent, P.; Spiegel, S.; Fisher P. B. Ceramide plays a prominent role in MDA-7/IL-24-induced cancer-specific apoptosis, **J. Cell Physiol.**, 222, 546–555, 2010.
- Seefelder, W.; Humpf, H.U.; Schwerdt, G.; Freudinger, R.; Gekle, M. Induction of apoptosis in cultured human proximal tubule cells by fumonisins and fumonisin metabolites. **Toxicol Appl Pharmacol**, 15;192(2):146-53, 2003.
- Soriano, J.M.; González, L.; Catalá, A.I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. **Prog Lipid Res.** 44(6):345-56, 2005.
- 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.** 1758(12):2027-36, 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, 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.
- Ueda, N.; Camargo, S.M.; Hong, X.; Basnakian, A.G.; Walker, P.D.; Shah S.V. Role of ceramide synthase in oxidant injury to renal tubular epithelial cells. **J. Am. Soc. Nephrol.** 12, 2384–2391, 2001.
- 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):14486-90, 1991.
- Wang, E.; Ross, P. F.; Wilson, T. M.; Riley, R. T.; Merrill, Jr. A. H. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies

- given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **J. Nutr.** 122:1706-1716, 1992.
- Wang, W.; Jones, C.; Ciacci-Zanella, J.; Holt, T.; Gilchrist, D.G.; Dickman, M.B. Fumonisin and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 16; 93(8): 3461-3465, 1996.
- Xin, M.; Deng, X. Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. **J Biol Chem.** 7;281(27):18859-67, 2006.
- 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, 183–192, 2013.
- Yoo, H.; Norred, W. P.; Wang, E.; Merrill Jr, A. H.; Riley, R. T. Fumonisin inhibition of de novo sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PKX cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 114:9-15, 1992.



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação de manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)

ISSN 0100-204X *versão impressa*

ISSN 1678-3921 *versão online*

Diretrizes para Autores

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em "comentários ao editor", informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em "resumo da biografia" de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em "incluir autor" para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

"Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado "....." e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer:

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos coautores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que compõem o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no [AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus](#) ou no [Índice de Assuntos da base SciELO](#).

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.

- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Redação das citações dentro de parênteses
- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.
- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:
- Resumo com 100 palavras, no máximo.
- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: sct.pab@embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB

Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito deve ser inédito e não pode ter sido submetido, simultaneamente, a outro periódico, e seus dados (tabelas e figuras) não podem ter sido publicados parcial ou totalmente em outros meio de publicação técnicos ou científicos (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas, etc.).
2. O texto deve ser submetido no formato do Microsoft Word, em espaço duplo, escrito na fonte Times New Roman 12, tamanho de papel A4, com páginas e linhas numeradas; e o arquivo não deve ultrapassar o tamanho de 20 MB.
3. O artigo deve ter, no máximo, 20 páginas e tem que estar organizado na seguinte ordem: Título; nome completo dos autores, seguido de endereço institucional e eletrônico; Resumo; Termos para indexação; Title, Abstract; Index terms; Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Referências; tabelas e figuras.
4. Os padrões de texto e de referências bibliográficas devem ser apresentados de acordo com as orientações, para a apresentação de manuscritos, estabelecidas nas Diretrizes aos autores, as quais se encontram na página web da revista PAB.
5. Mensagens de concordância dos coautores com o conteúdo do manuscrito e sua submissão à revista devem ser compiladas pelo autor correspondente em um arquivo do Microsoft Word e carregadas no sistema como um documento suplementar, no quarto passo do processo de submissão.
6. Diante do grande número de trabalhos recebidos para publicação (média de 110 por mês), solicitamos sua concordância com os seguintes procedimentos adotados pela revista PAB:

Os trabalhos são analisados pela Comissão Editorial, antes de serem submetidos à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se os seguintes aspectos, entre outros: escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura; resultados com contribuição significativa; qualidade das tabelas e figuras; e, finalmente, originalidade e consistência das conclusões.

Após a aplicação desses critérios, caso o número de trabalhos aprovados ultrapasse a capacidade de publicação mensal, é aplicado o critério da **relevância relativa**. Segundo esse critério, os trabalhos com contribuição mais significativa para o avanço do conhecimento científico são aprovados. Esse critério é aplicado apenas aos trabalhos que atendam aos requisitos de qualidade, mas que, por excederem a capacidade de publicação mensal da revista, não podem ser todos aprovados. Por esse mesmo motivo, informamos que não aceitamos pedido de reconsideração.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W3 Norte (final) Caixa Postal 040315 - Brasília, DF - Brasil - 70770-901

Fone: +55 (61) 3448-4231 / 3448-4162 - Fax: (61) 3272-4168

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons

Embrapa Informação Tecnológica - Pesquisa Agropecuária Brasileira
Caixa Postal 040315
70770-901 Brasília, DF Brasil
Tel.: + 55 61 3273-9616
Fax: + 55 61 3340-5483



pab@sct.embrapa.br