

EXPRESSÃO DOS GENES COLÁGENO TIPO 1 SUBUNIDADES ALFA 1, 2 E 3 NAS PELES DE DUAS VARIEDADES DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Maria Alice de Oliveira Gonçalves (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Angélica de Souza Khatlab, Eliane Gasparino (Orientador). E-mail: egasparino@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#). Zootecnia/Genética e Melhoramento dos Animais Domésticos

Palavras-chave: hidroxiprolina; proteína fibrosa; pigmentação da pele

RESUMO

Nosso objetivo foi avaliar se existe diferença no peso absoluto e relativo da pele, e na expressão dos genes colágeno tipo 1 subunidades alfa 1 (*COL1A1*), alfa 2 (*COL1A2*), alfa 3 (*COL1A3*), vimentin (*VIM*) e RNA helicase A dependente de ATP (*DHX9*) na pele de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) de cor cinza e vermelha. Para isso, 24 tilápias do Nilo (12 de cor cinza e 12 de cor vermelha), foram utilizadas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos referentes à pigmentação da pele das tilápias: pele cinza e pele vermelha. Após a eutanásia, os peixes foram pesados, em seguida os animais foram eviscerados, e então a pele foi retirada, identificada e pesada para obtenção do peso absoluto e relativo. Amostras de pele das tilápias cinzas (n = 12) e vermelhas (n = 12) obtidas do lado direito do corpo do animal na região superior próxima da cabeça, foram coletadas, para a análise de expressão gênica. As tilápias de pele cinza apresentaram maior peso relativo da pele, e as tilápias de pele vermelha apresentaram maior expressão dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *COL1A3* e menor expressão do gene *VIM*. Os resultados demonstraram que existe diferença no peso relativo da pele e, no mecanismo de transcrição do gene colágeno tipo 1 e seu gene regulador (*VIM*) na pele de tilápias do Nilo com diferentes colorações. Indicando que esse traço fenotípico (cor da pele) pode influenciar diferentes características dos animais, incluindo a quantidade de colágeno da pele.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) tem sido utilizada como material de curativo biológico para queimaduras e outros tratamentos, devido a diversas características benéficas como a disponibilidade praticamente ilimitada, o baixo custo, a excelente qualidade, e por ser uma substância segura sem reações cutâneas adversas após aplicação intracutânea e tópica (ALVES et al., 2018). O colágeno é um importante grupo de proteínas fibrosas de cadeia não ramificada presente na matriz extracelular, amplamente encontrado em tecidos animais e desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase tecidual, integridade biológica e mecânica estrutural (VERDE et al., 2021). O

colágeno tipo 1, é o mais comumente encontrado nos ossos, na pele, nos dentes, na fibrocartilagem e nos tendões dos animais. Esse colágeno se distingue dos outros por sua estabilidade da integridade estrutural que está correlacionada com o conteúdo de prolina e hidroxiprolina (REÁTEGUI-PINEDO et al., 2022).

O colágeno de peixe tem sido amplamente utilizado nos campos da medicina e da engenharia de tecidos, mostrando que a pele de peixe apresenta características típicas de colágeno tipo 1 altamente biocompatível (VERDE et al. 2021). No Brasil, grande parte do colágeno é obtida de subprodutos da indústria de carne bovina e suína, devido a sua alta produção para exportação. Contudo, doenças infecciosas zoonóticas, problemas alérgicos e restrições religiosas em muitos países, sobre a aplicação de certos isolados de mamíferos podem ser considerados como obstáculos, para o uso continuado do colágeno proveniente dessas espécies animais (VERDE et AL., 2021). Assim, a utilização de outras fontes de colágeno necessita ser exploradas. Nesse sentido, a pele de tilápia do Nilo vem sendo estudada e utilizada como uma fonte alternativa de colágeno, além das fontes bovinas e suínas. Entretanto, as características de qualidade do colágeno podem variar em função de diversos fatores incluindo a pigmentação da pele dos peixes.

Nesse sentido, nosso objetivo foi avaliar se existe diferença na expressão dos genes colágeno tipo 1 subunidades alfa 1 (*COL1A1*), alfa 2 (*COL1A2*), alfa 3 (*COL1A3*), vimentin (*VIM*) e RNA helicase A dependente de ATP (*DHX9*) na pele de tilápias do Nilo de com peles de cor cinza e cor vermelha.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos referentes à cor da pele das tilápias do Nilo: pele cinza e pele vermelha. Para a realização deste estudo, foram utilizadas 24 tilápias do Nilo (12 cinzas e 12 vermelhas), com 150 dias de idade e peso médio de 0,450 kg. Esses peixes foram obtidos da mesma desova e foram criados na Estação Experimental de Piscicultura (CODAPAR-UEM) em tanque escavado na densidade de 3 peixes/m³. Os parâmetros da água foram monitorados diariamente, duas vezes por dia as 09h00min e as 17h00min. O sistema de aeração utilizado foi o convencional funcionando de 30 e 30 minutos durante 12 horas, com descanso de 12 horas. Todos os peixes (n = 12 cinzas e n = 12 vermelhos) foram coletados aos 150 dias de idade um por um e, em seguida foram submergidos em água e gelo (1:1).

Após detecção da insensibilização dos animais, o cordão espinhal foi seccionado. Logo após a eutanásia, os animais foram pesados, eviscerados e então a pele foi retirada com o uso de alicate específico, iniciando-se a tração da retirada da pele, da região dorsal e do corte contornando a cabeça em direção a região caudal e ventral. As peles do lado direito e esquerdo do corpo do peixe, foram identificadas e pesadas para obtenção do peso absoluto e relativo da pele (peso da pele/peso do peixe x 100)).

Pequenos fragmentos da pele (sem escama) das tilápias cinzas (n = 12) e vermelhas (n = 12) obtidas do lado direito do corpo do animal na região superior próxima da cabeça, foram coletadas, lavadas com soro fisiológico gelado, em seguida foram adicionadas em tubos criogênicos e congelados em nitrogênio líquido.

Subseqüentemente as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento da análise de expressão gênica.

O RNA total das amostras de pele foi extraído com o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) de acordo com as normas do fabricante. A pureza e integridade do RNA total de cada amostra foi determinada por meio das razões 260/280 nm e 260/230 nm obtidas no espectrofotômetro NanoDrop 2000-c (Thermo Fisher Scientific). O RNA total foi tratado com o kit DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation) de acordo com as instruções do fabricante, e as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o momento do seu uso.

As reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas usando o composto fluorescente PowerUP SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania) no termociclador StepOne Real Time PCR System versão 2.3 (Applied Biosystems) em duplicata, e os parâmetros do ciclo térmico para todos os genes foram realizados conforme sugerido no protocolo do PowerUP SYBR® Green Master Mix.

Os genes colágeno tipo 1 alfa 1 (*COL1A1*, nº de acesso: AB603656.1), alfa 2 (*COL1A2*, nº de acesso: AB603657.1), alfa 3 (*COL1A3*, nº de acesso: AB603658.1), vimentin (*VIM*, nº de acesso XM_003438066.5) e RNA helicase A dependente de ATP (*DHX9*, nº de acesso: XM_025900168.1), específicos para a espécie *Oreochromis niloticus* foram desenhados de acordo com as sequências depositadas no site www.ncbi.nlm.nih.gov, usando o software para desenho de primer disponível no site www.idtdna.com. A beta actina específica para a espécie *Oreochromis niloticus* foi utilizada como gene endógeno da reação (nº de acesso: 100534414). O método $2^{-\Delta\text{Ct}}$, foi utilizado para a quantificação relativa da expressão gênica e os resultados obtidos são apresentados como unidade arbitrária (UA).

Os dados foram analisados por meio da ANOVA one-way. O modelo estatístico utilizado foi o $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$, onde Y_{ij} é a variável dependente, μ é a média geral, α_i é efeito dos tratamentos (i = tilápia cinza ou tilápia vermelha), e e_{ij} é o termo de erro residual. As médias foram comparadas pelo teste t de Student ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito significativo da cor da pele das tilápias sobre o peso absoluto da pele ($P=0,4379$). Contudo, houve efeito significativo da cor da pele da tilápia sobre o peso relativo da pele ($P=0,0035$), sendo verificado que as tilápias de cor cinza apresentaram maior peso relativo da pele.

Com relação à expressão dos genes *COL1A1*, *COL1A2*, *COL1A3* e *VIM*, observamos que as tilápias vermelhas apresentaram maior expressão dos genes *COL1A1* (2,69 UA; $P=0,0200$), *COL1A2* (9,38 UA; $P=0,0032$), *COL1A3* (2,41 UA; $P=0,0141$) e menor expressão do gene *VIM* (0,006 UA; $P=0,0206$) que as tilápias cinzas (*COL1A1* 1,26 UA; *COL1A2* 3,19 UA *COL1A3* 1,06 UA e *VIM* 0,012 UA). Não houve efeito da cor da pele das tilápias sobre a expressão do gene *DHX9* ($P = 0,5237$).

Nossos resultados indicam que embora os peixes de pele cinza tenham menor expressão gênica das subunidades do colágeno tipo 1, o processo de síntese do colágeno nestes animais pode estar ocorrendo de maneira mais eficiente, uma vez que o gene *VIM* essencial para a transcrição e, estabilidade do mRNA do colágeno foi mais expresso na pele dos peixes cinzas. Esses resultados sugerem que o mecanismo transcricional do gene colágeno tipo 1 e seu gene regulador (vimentin) é mais eficiente em tilápias do Nilo cinzas, o que provavelmente promoveu uma deposição maciça de colágeno na pele, e que por sua vez pode ter contribuído para o maior peso relativo da pele observado nesses peixes.

CONCLUSÕES

Existe diferença no peso relativo da pele e no mecanismo de transcrição do gene colágeno tipo 1 e seu gene regulador, na pele de tilápias do Nilo com diferentes colorações. Indicando que esse traço fenotípico (cor da pele) pode influenciar diferentes características dos animais, incluindo a quantidade de colágeno da pele.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Maringá, ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Departamento de Zootecnia.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. P. N. N.; LIMA JÚNIOR, E. M.; PICCOLO, N. S.; MIRANDA, M. J. B.; VERDE, M. E. Q. L.; FERREIRA JÚNIOR, A. E. C.; SILVA, P. G. B.; FEITOSA, V. P. BANDEIRA, T. J. P. G.; MATHOR, M. B. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. **Cell and Tissue Banking**, v. 19, n. 3, p. 373-382, 2018.
- REÁTEGUI-PINEDO, N.; SALIRROSAS, D.; SÁNCHEZ-TUESTA, L.; QUIÑONES, C.; JÁUREGUI-ROSAS, S. R.; BARRAZA, G.; CABRERA, A.; AYALA-JARA, C.; MARTINEZ, R. M.; BABY, A. R.; PRIETO, Z. A. Characterization of collagen from three genetic lines (gray, red and F1) of *Oreochromis niloticus* (Tilapia) skin in young and old adults. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1123, 2022.
- STEFANOVIC, B. RNA protein interactions governing expression of the most abundant protein in human body, type I collagen. **Wires RNA**, v. 4, n. 5, p. 535-545, 2013.
- VERDE, M. E. Q. L.; FERREIRA-JÚNIOR, A. E. C.; BARROS-SILVA, P. G.; MIGUEL, E. C.; MATHOR, M. B.; LIMA-JÚNIOR, E. M.; MORAES-FILHO, M. O.; ALVES, A. P. N. N. Nile tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen. **Acta Histochemica**, v. 123, n. 6, p. 151762, 2021.