

Suplementação com beta-caroteno produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* geneticamente editada diminui a expressão da enzima glutathiona S-transferase em zebrafish (*Danio rerio*)

**KAILANE FLÔRES MARTINS¹; ANA CAROLINA TEIXEIRA DE OLIVEIRA²;
MATEUS TAVARES KUTTER³; DANIELA VOLCAN ALMEIDA⁴**

¹Universidade Federal de Pelotas – kailanefloresmartins@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – anacarolinateixeira_@live.com

³Universidade Federal de Pelotas – kutter.m.t@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – danivolcan@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são um grupo de pigmentos lipossolúveis e tetraterpênicos amarelos, alaranjados e vermelhos, amplamente encontrados na natureza, que são sintetizados por plantas, algas e microrganismos. Em geral, os animais não podem biossintetizá-los, portanto, devem ser obtidos a partir da dieta (LIU et al., 2019). Os carotenoides são divididos em dois grupos principais: as xantofilas, que possuem átomos de oxigênio, e os carotenos, que são hidrocarbonetos (HUANG et al., 2017). Há uma variedade de funções biológicas encontradas nos carotenoides, como propriedades fotoprotetoras, resistência a danos oxidativos e reguladores de expressão gênica (CRUZ et al., 2021).

Dentre os carotenos, o beta-caroteno se destaca, sendo conhecido como precursor de retinoides, chamados de pró-vitamina A, e tem recebido grande atenção devido às suas propriedades imunoestimulantes, melhorando a ação antioxidante e a resposta imunológica dos organismos (MAOKA, 2020). Na indústria da aquicultura, os carotenoides são frequentemente adicionados às dietas de salmonídeos, crustáceos e outros peixes, como os ornamentais, principalmente para atuar como pigmentos e conferir a coloração desejada a esses organismos. Essa coloração não só melhora a aparência visual dos peixes, mas também influencia a percepção dos consumidores, que subconscientemente associam cores mais vibrantes com maior qualidade, valor nutritivo, sabor e frescor dos produtos (CRUZ et al., 2021).

Nos peixes, os carotenoides desempenham funções semelhantes às observadas em outras espécies animais. No entanto, durante a maturação sexual, esses nutrientes são mobilizados dos músculos para as gônadas, o que impacta diretamente o desempenho reprodutivo, contribuindo significativamente para o desenvolvimento dos ovários e aumentando as taxas de fertilização (GARCÍA-CHAVARRÍA; LARA-FLORES, 2013). Além de usarem esses pigmentos para comunicação intraespecífica, como sinalização sexual, e interespecífica, como coloração de advertência ou camuflagem (MAOKA, 2020). De acordo com LIU et al., 2019, em algumas espécies de peixes e crustáceos, os carotenoides aumentam seu crescimento e sobrevivência, e previnem efeitos deletérios da peroxidação lipídica. Esses efeitos estão associados à presença de várias ligações duplas conjugadas na estrutura molecular dos carotenoides, o que é capaz de neutralizar os radicais livres, inibindo a ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar estresse oxidativo.

Para combater o dano oxidativo, os organismos dispõem de enzimas que promovem o processo de desintoxicação celular. Entre essas enzimas está a glutathiona S-transferase (GST), uma enzima citosólica dimérica que oferece

defesas antioxidantes e desempenha um papel fundamental na desintoxicação metabólica, ajudando a neutralizar compostos tóxicos e a reduzir os efeitos do estresse oxidativo (LATIEF et al., 2018).

Nesse contexto, há evidências crescentes de que os carotenoides são suplementos benéficos para várias espécies na aquicultura, com efeitos desde o aumento do seu crescimento, melhora no desempenho reprodutivo e resistência a patógenos (GARCÍA-CHAVARRÍA; LARA-FLORES, 2013), o que tem aumentado sua valorização no mercado de compostos bioativos. A partir disso, esse estudo avaliou se o beta-caroteno produzido, de forma heteróloga, na levedura *Yarrowia lipolytica* altera a expressão gênica de enzimas antioxidantes em juvenis de zebrafish (*Danio rerio*).

2. METODOLOGIA

A levedura *Yarrowia lipolytica* geneticamente manipulada foi gentilmente cedida pelo Prof. Rodrigo Almeida da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Assim, três dietas foram formuladas visando atender às exigências do zebrafish. Uma dieta controle (CSL), sem adição de levedura, uma dieta com levedura sem beta-caroteno (CCL), e outra com levedura e beta-caroteno 100mg.kg⁻¹ (BETA).

Foram utilizados 5 animais para cada unidade experimental (CSL, CCL, BETA) com triplicata (3x n=15 por grupo). Todos os grupos experimentais foram mantidos em aquários de 1L com aeração constante e com todos os parâmetros de qualidade de água monitorados e adequados para a espécie. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração (5% do peso/peixe) por 2 semanas. No início, em 7 e 14 dias os peixes foram anestesiados com tricáína (170 mg/L) e submetidos à análise de parâmetros biométricos. Ajustes de quantidade de ração ofertada em relação aos pesos dos animais foram feitos após as análises biométricas. Ao final de 2 semanas de alimentação, os peixes foram eutanasiados (tricáína 600mg/L) e dissecados para posteriores análises de expressão de genes. Foram calculados taxa de crescimento relativo (RGR); taxa de crescimento instantâneo (G) e o fator de condição de Fulton (K). A RGR foi expressa como a porcentagem no aumento do peso corporal (W) após 13 dias, enquanto G representou a taxa de crescimento exponencial. As equações utilizadas foram: $RGR = (W_{final} - W_{inicial}) \times (W_{inicial})^{-1} \times 100$; $G = [\ln(W_{final} - W_{inicial}) \times 13^{-1}]$ e $K \text{ de Fulton} = (W / L^3) \times 100$, onde W é o peso corporal em gramas e L é o comprimento total em centímetros.

A análise de expressão gênica foi realizada em fígado, nos três grupos experimentais, através de RT-qPCR. Primeiramente, foi feita a extração de RNA total, utilizando o reagente Trizol e o tratamento com DNase I. A integridade do RNA foi avaliada e quantificada em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Para a amplificação e quantificação dos transcritos foi utilizado o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Todas as análises descritas acima utilizaram as instruções do fabricante.

Foi analisada a expressão dos genes glutationa S-transferase alfa 1 (*gst1a*), glutationa S-transferase-Rho (*gstrho*) e glutationa peroxidase (*gpx*). Como genes normalizadores foram usados o fator de alongamento 1 alfa (*ef1a*), beta-2-microglobulina (*b2m*) e a proteína ribossomal L13 (*rpl13*) utilizando primers específicos. Foram comparados valores de Ct (limiar do ciclo) usando como controle o grupo CCL, através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism®. Os valores obtidos foram analisados

estatisticamente por análise de variância unidirecional (ANOVA) e o teste *post hoc* Tukey. As diferenças foram consideradas significativas se $p \leq 0,05$. Os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os peixes aceitaram todas as dietas testadas e nenhuma mortalidade ocorreu ao longo dos 14 dias experimentais. A taxa de crescimento dos zebrafish suplementados com betacaroteno não apresentou diferença significativa em relação aos alimentados sem betacaroteno (Fig. 1d, e). Possivelmente devido ao curto período de suplementação, pois estudos com *Oreochromis niloticus* relatam uma melhora no crescimento em termos de ganho de peso quando alimentados com dietas de 50mg/kg de betacaroteno durante 10 semanas (HASSAAN et al., 2021). Já no estudo de AMAR et al. (2012) relatam que a suplementação com carotenoides 100mg/kg, entre eles o betacaroteno, durante 6 semanas não melhorou o crescimento da truta arco-íris, embora tenha melhorado seus parâmetros de resposta imunológica. Essa controvérsia sobre o papel dos carotenoides no crescimento de peixes já foi descrita por GARCÍA-CHAVARRÍA; LARA-FLORES (2013), já que alguns estudos relatam efeitos positivos, enquanto outros não observam nenhum impacto.

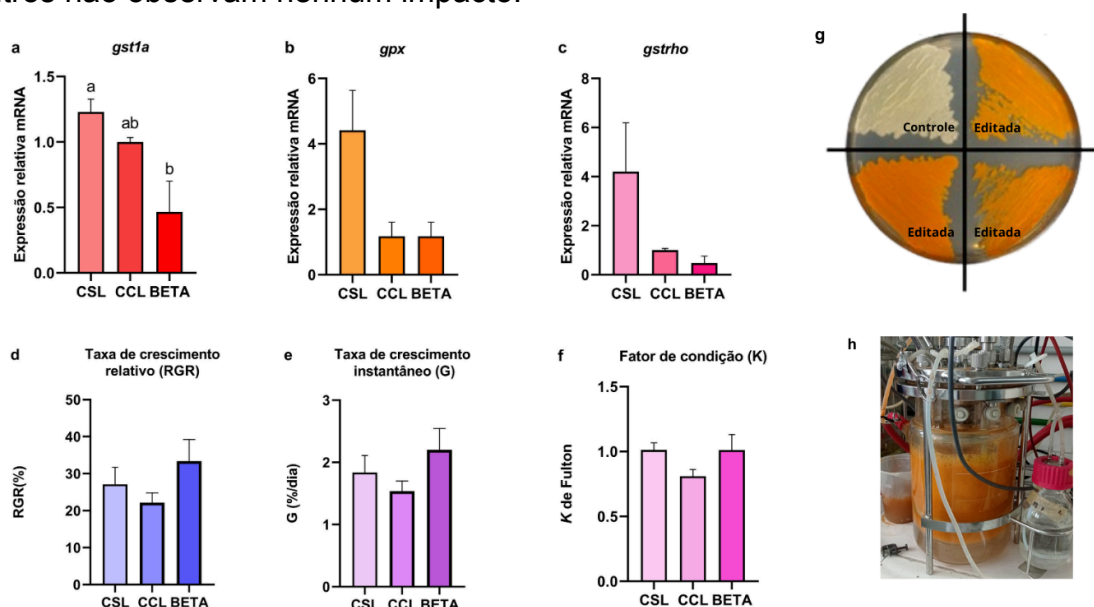


Figura 1 - Expressão relativa de mRNA em fígados de juvenis de zebrafish (*Danio rerio*) com levedura e betacaroteno (BETA), somente com levedura (CCL) e sem levedura e sem betacaroteno (CSL). (a) Expressão dos genes glutathione S-transferase alfa 1 (*gst1a*); (b) glutathione S-transferase-Rho (*gstrho*); (c) glutathione peroxidase (*gpx*). (d) Taxa de crescimento relativo (RGR); (e) Taxa de crescimento instantâneo (G) ao longo dos 13 dias; (f) Fator de condição (fator de Fulton K); (g) Placa de cultivo da levedura *Yarrowia lipolytica* controle e geneticamente editada; (h) Cultivo em biorreator da cepa geneticamente editada. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Na comparação da expressão gênica entre os grupos experimentais, a suplementação com associação da levedura e betacaroteno diminuiu a expressão do gene *gst1a* (Fig. 1a), enquanto os genes *gpx* e *gstrho* não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 1b,c), indicando que a

subunidade *gst1a* é a mais responsiva ao efeito antioxidante do betacaroteno.

A suplementação com betacaroteno é capaz de alterar a expressão de genes de enzimas antioxidantes. A diminuição da síntese gênica da *gst1a* pode estar atribuída ao efeito do baixo nível nutricional da ração CSL, ou seja, o grupo suplementado com o BETA supriu o efeito estressor da ração sem levedura, promovendo uma regulação de feedback negativo na via transcricional da GST. O estudo de BACCHETTA et al. (2019) encontrou uma diminuição da expressão da GST nas brânquias de *P. mesopotamicus* suplementados com betacaroteno.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a inclusão de betacaroteno produzido na levedura *Y. lipolytica* nas dietas de zebrafish tem potencial para melhorar o status nutricional da ração em termos antioxidantes, evidenciado pela alteração na expressão do gene que codifica para a *gst1a*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAR, E. et al. Resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) experimental infection following ingestion of natural and synthetic carotenoids. **Aquaculture**, v. 330–333, p. 148-155, 2012.

BACCHETTA, C. et al. Dietary β -Carotene Improves Growth Performance and Antioxidant Status of Juvenile *Piaractus mesopotamicus*. **Aquac. Nutr.**, 2019.

CHENG, D. et al. An improving method for extracting total carotenoids in an aquatic animal *Chlamys nobilis*. **Food Chemistry**, v. 280, p. 45-50, 2019.

CRUZ, J. et al. Carotenoid coloration and coloration-linked gene expression in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissues. **BMC Veterinary Research**, 2021.

GARCÍA-CHAVARRÍA, M; LARA-FLORES, M. The use of carotenoid in aquaculture. **Research Journal of Fisheries and Hydrobiology**, v. 8, 2013.

HASSAAN, M. et al. Comparative study on the effect of dietary β -carotene and phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* on immune-oxidative stress biomarkers, genes expression and intestinal enzymes, serum biochemical in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 108, 2021.

HUANG, J. et al. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton, **Biotechnology Advances**, v. 35, 2017.

LATIEF, U. et al. β -Carotene supplementation ameliorates experimental liver fibrogenesis via restoring antioxidant status and hepatic stellate cells activity. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 168-180, 2018.

LIU, F. et al. Effects of carotenoids on the growth performance, biochemical parameters, immune responses and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) under high-temperature stress. **Aquaculture**, 2019.

MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **J Nat Med**, 2020.