

Expressão gênica das enzimas gliconeogênicas na placenta de fêmeas bovinas

Luiz Cláudio Miletti², Kaio César Simiano Tavares³, Geila Maria Zanardi⁴, Patrícia Hermes Stocó⁵,
Edmundo Carlos Grisard⁶, Luciana
Bertolini⁷, Marcelo Bertolini⁸

Palavras-chave : Placenta, Gliconeogênese, RNA

Uma característica singular do desenvolvimento precoce dos mamíferos é a provisão de nutrientes do organismo materno por intermédio da placenta. Para o feto, a placenta consiste na combinação, em apenas um órgão, de muitas atividades funcionais, que no adulto são separadas e, além disso, possui um intenso metabolismo. O objetivo deste estudo será caracterizar se a placenta bovina realiza gliconeogênese, que consiste em uma via metabólica capaz de sintetizar D-glicose a partir de compostos que não são carboidratos, como a alanina, lactato, glicerol e ácido propiônico. A gliconeogênese foi demonstrada na placenta de ratas e de mulheres, mas não há nada descrito em bovinos. Este estudo propiciou informações do metabolismo normal da placenta, as quais poderão ser úteis no entendimento de alterações no suprimento de substratos ao concepto. Um exemplo de tais alterações é a “Síndrome dos Bezerros Absolutamente Grandes”, onde bezerros provenientes da técnica de produção *in vitro* (PIV) e/ou cultivo *in vitro* (CIV) de embriões freqüentemente apresentam alto peso ao nascer. Esse crescimento acelerado é especificamente pré-natal e os mecanismos responsáveis pela síndrome são desconhecidos. Na procura de uma explicação fisiológica para um problema que é primariamente pré-natal, alterações na função placentária causadas pelas técnicas de PIV e/ou CIV fornecem um papel lógico.

Para realizar este estudo avaliamos a expressão gênica na placenta das três enzimas gliconeogênicas frutose-1,6-bisfosfatase (F1,6B), glicose-6-fosfatase (G6P) e fosfoenolpiruvatocarboxiquinase (PEPCK) em 15 fêmeas bovinas nos três terços gestacionais. O RNA total dos fragmentos de placenta foi isolado pelo método Trizol a partir do qual sintetizamos o cDNA (DNA complementar) através da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa(RT-PCR). Em seguida amplificamos os fragmentos de cDNA correspondentes ao mRNA das três enzimas gliconeogênicas pela reação em cadeia

da polimerase (PCR). Para isso foram sintetizados seis oligonucleotídeos senso e anti-senso respectivamente, desenhados a partir de seqüências específicas para bovinos (*Bos Taurus*), obtidos do banco de dados do NCBI: F1,6B (TCCTCTCCAATGACCTGGTT) / (CTTCCACTGGGGCTTTTCT); G6P (CTTTGGTGGGTCCATGAGT) / (GCCGCTCACACCACTTAGAG); PEPCK (GGAGGAGGGTGTGATCAAGA) / (GTGGAGGCACTTGACGAACT). Os fragmentos de tamanho esperado foram observados nos três períodos gestacionais, bem como no fígado que foi utilizado como controle positivo e resolvidos em gel de agarose 1%. Estes fragmentos foram clonados utilizando-se o Kit TOPO TA Cloning e sequenciados, confirmando as seqüências esperadas de amplificação. Após a confirmação da expressão gênica das três enzimas gliconeogênicas, partimos para a análise protéica. Para isso parte da seqüência peptídica de cada enzima foi sintetizada e inoculada em camundongos para obtenção do soro com anticorpos específicos, e em seguida serem utilizados no teste Western Blot que atualmente encontra-se em andamento.

1 Projeto de Pesquisa CAV/UDESC.

2 Orientador, professor do Departamento de Produção Animal e Alimentos- Centro de Ciências Agroveterinárias - Av. Luiz de Camões, 2090 - CEP 88520-000 - Lages - SC.

3 Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária – CAV/UDESC, bolsista de iniciação científica do PROBIC/UDESC.

4 Mestranda do Curso de Mestrado em Ciência Animal CAV/UDESC

5. Doutoranda do Programa de Biotecnologia da UFSC.

6. Professor do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC

7 Professora Colaboradora

8. Professor do Departamento de Produção Animal e Alimentos - CAV/UDESC