EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS LIPOGÊNICAS EM EXPLANTES MAMÁRIOS DE OVELHAS LACTANTES CULTIVADOS "*IN VITRO*" COM ÁCIDO PALMÍTICO

Blenda Fernandes Barroso[1], Priscila Cristine Carraro[2], Dimas Estrasulas de Oliveira[3]

[1] Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV - bolsista PIBIC/CNPq.
[2] Acadêmica do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – CAV.
[3] Orientador, Departamento de Produção Animal e |Alimentos - CAV – dimas.oliveira@udesc.br.

Palavras-chave: Gordura do leite. Metabolismo lipídico. Suplementação.

Dentre os constituintes do leite, a gordura é um componente importante, pois corresponde à maior parte do teor energético do mesmo. A suplementação lipídica com substâncias ricas em ácidos graxos (AG) saturados, como por exemplo, o ácido palmítico (C16:0), tem se mostrado eficiente em dar suporte à produção e aumentar o teor de gordura do leite. Pelo menos parte desse aumento é em função da maior secreção de ácidos graxos com 16 carbonos no leite. Os AG do leite são oriundos de duas fontes: AG da síntese *de novo*, formados nas células do epitélio mamário (cadeia curta e média), e AG pré-formados, captados da circulação sanguínea (cadeia média e longa). Diante disso, técnicas moleculares de análise envolvendo expressão desses genes têm auxiliado no conhecimento dos mecanismos moleculares relacionados à síntese de lipídeos pela glândula mamária lactante em ruminantes. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ácido palmítico (AP) na expressão gênica de duas isoformas da acetil-CoA carboxilase alfa (ACC-α - regiões promotoras II e III) transcritas na glândula mamária, e da ácido graxo sintase (FASN). Foram realizados cultivos de explantes mamários de três ovelhas da raça Lacaune com 40 dias de lactação. As amostras foram obtidas através de biópsia com prévia anestesia local, no ponto médio da metade direita ou esquerda do úbere, utilizando agulha co-axial (Bard TruGuide) e instrumento específico para biópsia (Bard Max-Core), sendo aplicado antiinflamatório imediatamente após o procedimento. As amostras foram colocadas em meio de cultivo, alocadas em caixa de isopor com gelo e transportadas para o laboratório do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA – CAV/UDESC). Os explantes foram cultivados em placas de seis poços (Nunclon), em estufa a 37°C, 5% de CO2 no ar e atmosfera com umidade saturada, durante 24 horas, utilizando os seguintes tratamentos: Controle [meio de cultivo + albumina bovina (BSA)] e ácido palmítico [meio de cultivo + AP 99% (diluído em BSA para obter a concentração de 75 µM por poço)]. Posteriormente foi extraído o RNA total com a utilização do Kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen Sciences) e a possível contaminação por DNA foi removida por tratamento com DNase (Sigma-Aldrich). A pureza do RNA foi verificada utilizando-se espectrofotômetro NanoDrop, ND-2000 (NanoDrop Technologies), e posteriormente realizou-se a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit GeneAmp (Applied Biosystems) com "random primers". Para análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) utilizou-se a SYBR Green (Promega) com o uso de primers específicos para cada um dos genes avaliados. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS, utilizando o procedimento MIXED, sendo o tratamento considerado efeito fixo e a amostra efeito aleatório e, utilizando-se como co-variável a média geométrica dos "housekeeping" (proteína ribossomal S18

e beta-actina), com os efeitos declarados significativos quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $0,05 < P \leq 0,10$. Não foram detectadas diferenças na expressão gênica da ACC-α PII e a FASN ($P = 0,10$ e $P = 0,13$, respectivamente) entre tratamento controle e ácido palmítico, enquanto a isoforma ACC-α PIII ($P = 0,08$), apresentou tendência a aumentar a expressão gênica sob o efeito do AP (Figura 1). O fornecimento de suplementos ricos em ácido palmítico para vacas e ovelhas lactantes têm mostrado efeito positivo sobre o teor de gordura do leite, principalmente pelo aumento de AP (C16:0) quando se observa o perfil de ácidos graxos, o que se supõe como sendo pelo aumento da oferta de AP pré-formado vindo da dieta. Como o AP é o produto final da síntese *de novo*, poderíamos imaginar então que esta sua síntese na glândula mamária poderia ser menor e com isso diminuir a expressão gênica das enzimas estudadas. Entretanto, observa-se também em alguns estudos um aumento de certos ácidos graxos de cadeia curta e média (ex: C8:0, C10:0, C12:0, C14:0) o que pode justificar a tendência ao aumento da expressão gênica da isoforma da ACC-α oriunda do promotor III. Ressalta-se aqui que essa isoforma é expressa somente na glândula mamária. São necessárias outras análises da expressão gênica dos fatores de transcrição e dos genes que codificam enzimas envolvidas na captação, transporte e ativação intracelular, dessaturação de AG e síntese de triglicerídeos, para melhor avaliar os efeitos do AP sobre a expressão gênica dos genes envolvidos na síntese de gordura na glândula mamária.

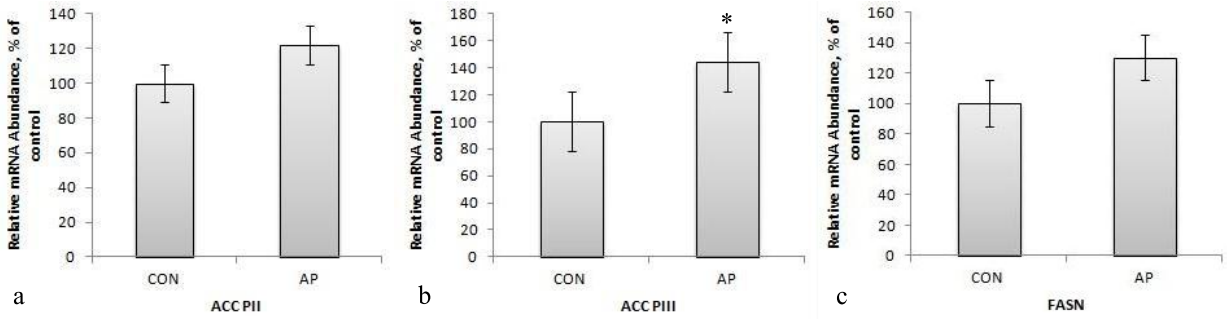

Fig. 1 *Efeitos da suplementação "in vitro" com ácido palmítico na acetil-CoA carboxilase alfa (ACC) promotores II (a) e III (b) e na ácido graxo sintase (FASN) (c), em explantes de glândula mamária de ovelhas lactantes. Os valores são as médias ± do erro padrão. *Valor de $P \leq 0,10$ entre tratamentos. n = 6 (CON) e 6 (AP).*