



**Palavras-chave:** Rt-qpcr. Expressão gênica. Proteínas juncionais. Barreira intestinal

## Introdução/Objetivo:

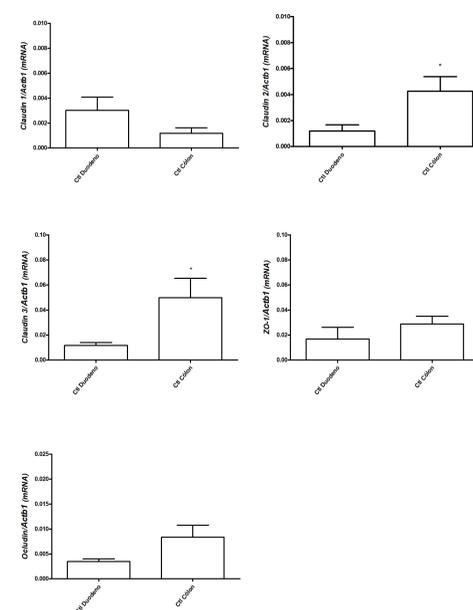
RT-PCR é uma técnica difundida em análises moleculares, sendo considerada um padrão-ouro. Usamos o RT-qPCR (q = quantitativo) na quantificação do nível de expressão de genes que codificam proteínas de adesão e comunicação intercelular associadas às junções intercelulares, a fim de investigar o seu papel na homeostasia tecidual, particularmente do tecido epitelial. Esta pesquisa consiste em estudar o papel da barreira epitelial intestinal mediada pela JO (junção de oclusão) na patogênese da diabetes melito tipo 2 (DM2). Como modelo animal do DM2, empregamos camundongos C57 alimentados com dieta hiperlipídica, que são comparados com camundongos controle que recebem ração padrão, analisando-se a expressão de genes de proteínas da JO no epitélio intestinal de camundongos controle por RT-qPCR.

## Metodologia:

Fragments do duodeno e cólon de camundongos controle (n=5) foram coletados e o epitélio foi raspado com auxílio de um bisturi. Foi feita extração de RNA total com Trizol, dosagem e síntese de cDNAs, sendo diluídos para as reações de RT-qPCR (Reação de Polimerização em Cadeia seguida de Transcrição Reversa, quantitativo) utilizando-se curvas de calibração preparadas em nosso laboratório para os seguintes genes de junções de oclusão: Claudinas 1, 2 e 3, Ocludina e ZO-1. Além destas 5 curvas de calibração, foi feita uma curva de Beta-actina, um controle endógeno, a fim de descartarmos falso-positivos. Realizou-se quantificação absoluta dos níveis de expressão gênica através do número absoluto de moléculas amplificadas de cada cDNA em relação à cada uma das curvas de calibração preparadas.

## Resultados

Através da análise por RT-qPCR, observamos uma expressão diferencial dos genes das proteínas juncionais no epitélio dos dois segmentos intestinais amostrados (duodeno, segmento do intestino delgado e cólon, segmento do intestino grosso). O epitélio do cólon mostrou uma expressão significativamente maior de Claudinas-2 e -3 ( $P < 0,05$ ) e uma tendência de Ocludina ( $P = 0,07$ ), enquanto que a expressão de Claudina-1 e ZO-1 não foi estatisticamente diferente entre os dois segmentos ( $P = 0,16$ ). A expressão relativamente maior dessas proteínas da JO no cólon está em acordo com as propriedades da barreira epitelial nesse segmento que é menos permeável a macromoléculas que nos segmentos do intestino delgado (Markov et al., 2010). Em experimentos futuros, iremos empregar as reações de RT-qPCR para verificar se a expressão dessas proteínas juncionais está alterada nos diferentes segmentos intestinais de camundongos diabéticos alimentados com dieta hiperlipídica, com o intuito de se estudar o papel da JO na patogênese da DM2.



Legenda: Expressão gênica avaliada por qPCR absoluto normalizado contra controle endógeno Actb1 em homogenatos de epitélio de duodeno e cólon de camundongos-controle. Valores representam médias+ SEM da razão entre proteína Tj/expressão de Actb1 (5-7 animais/grupo)

## Conclusão:

O uso da técnica RT-qPCR nos permitiu constatar, em camundongos, uma expressão gênica diferencial de proteínas da JO no epitélio de segmentos intestinais que reconhecidamente diferem quanto às suas propriedades de barreira de permeabilidade. A técnica de qPCR absoluto pode ser utilizada como uma importante ferramenta para identificar o grau de expressão gênica de determinadas proteínas, permitindo correlacionar o papel dessas proteínas com a fisiologia dos órgãos, bem como investigar alterações associadas a doenças/disfunções.