

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas**

**Projeto: Análise da expressão gênica de células
pulmonares de camundongos *Mus musculus* submetidos
a fumo induzido**

João Henrique

Lúcia Carvalho Costa

Marcela França Dias

Pedro Henrique Ferreira de Campos Viana

Rafaella Timoteo Rômer

Renan Gadoni Canaan

1 Introdução

O cigarro é um dos produtos de maior consumo mundial e o hábito de fumar já é um costume consagrado em praticamente todo o mundo. Aproximadamente 3 milhões de pessoas morrem por ano ao redor do globo devido a patologias relacionadas com o tabagismo (PETO 2006). As doenças fatais mais comumente diagnosticadas nesses casos são a obstrução pulmonária crônica (COPD), o câncer de pulmão, a tuberculose pulmonária (ZHANG 2003) e doenças cardiovasculares (EZZATI 2004), cujas causas estão significativamente ligadas ao hábito de fumar (SRIDHAR 2008). O cigarro também pode causar uma imensa gama de outras doenças que nem sempre levam a morte, como diversos tipos de câncer, doenças relacionadas com hormônios, doenças gastrointestinais, doenças respiratórias, além de, durante a gestação, poder causar muitos males ao feto. Estudos preliminares mostram que o fumo causa campos de dano molecular através dos epitélios das vias aéreas expostas ao cigarro (SRIDHAR 2008) que seriam responsáveis por essas patologias.

No Brasil estima-se que cerca de 200mil mortes por ano são decorrentes do fumo. Em função disso desde 1985 o governo brasileiro vem criando intervenções para o controle do tabagismo (IGLESIAS 2007). Uma das medidas tomadas foi a criação do Programa Nacional de Controle do Tabagismo em 1989 com o objetivo de reduzir a prevalência de fumantes e conseqüentemente a morbi-mortalidade relacionada com o fumo no Brasil. Em decorrência da ação do PNCT a atual legislação brasileira, uma das mais fortes do mundo, proíbe, desde 2000, a propaganda de produtos de tabaco nas revistas, jornais, TV, radio, internet, outdoors, sendo permitida apenas nos pontos internos de venda. Também não é permitido o uso de descritores como light, ultralight, suave, dentre outros, e as empresas de tabaco são obrigadas a inserirem advertências com imagens ilustrativas nas embalagens de cigarro. Além disso, é proibido o patrocínio de eventos culturais e esportivos por marcas de cigarro, o fumo em ambientes públicos e fechados e a venda de cigarros para menores.

Apesar das muitas campanhas antitabaco promovidas por diversas entidades, o consumo de cigarro não tem diminuído satisfatoriamente. Em 1999, por exemplo, a média mundial de cigarros consumidos por pessoa caiu somente 3% (BROWN 2001). Uma possível explicação para esse alto índice de consumo é a influência das indústrias tabagistas, algumas das mais lucrativas e poderosas do capitalismo contemporâneo (BOEIRA 2006). Essas empresas criaram meios de incentivar o fumo durante um século (BROWN 2001), lançando mão de diversos recursos como o marketing e atuação política junto a congressistas, órgãos públicos e mídia, construindo desse modo uma relação de cooperação, competição e independência entre as empresas (BOEIRA 2006).

2 Justificativa

Tendo em vista o número assustador de mortes com causas relacionadas ao fumo e a baixa eficiência das medidas antitabaco, é necessário que sejam buscadas novas maneiras de prevenção e remediação das patologias do cigarro. Para que isso possa ser feito, primeiro é preciso acumular conhecimentos sobre o efeito do cigarro no organismo, que é um dos objetivos deste trabalho. Além disso, o conhecimento acerca de expressão gênica contido neste trabalho se constitui numa importante prospecção para que se possam utilizar ferramentas de biotecnologia como auxiliares no combate das doenças causadas pelo tabagismo.

Com o crescente avanço de biotecnologia que vem ocorrendo nos últimos anos, é bem provável que, se a hipótese que o fumo influi na expressão gênica esteja correta, seja possível combinar este trabalho a outros posteriores a fim de criar uma terapia que possa prevenir, minimizar ou remediar os efeitos do tabaco sobre o organismo humano.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O projeto visa uma maior compreensão dos efeitos do fumo sobre o organismo. Esse conhecimento poderia possibilitar o desenvolvimento de medidas de prevenção e remediação dos efeitos do tabagismo.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar se ocorre diferença na expressão gênica de camundongos submetidos ou não ao fumo através da técnica do Microarray.
- Caso for constatado, identificar os genes que demonstraram diferença de expressão.
- Confirmação dos resultados à partir de novos experimentos utilizando a técnica do Northern Blot.

4 Metodologia

4.1 Delineamento geral

Serão preparadas 6 câmaras cada qual contendo 8 camundongos (*Mus musculus*), totalizando 48 indivíduos (prole obtida a partir de um mesmo casal). Em 3 delas, os animais serão submetidos ao fumo, enquanto as outras três constituirão um grupo controle. Todas as demais condições (bióticas e abióticas) serão mantidas constantes para ambos os grupos (experimental e controle). Dentro de cada câmara, os animais serão divididos em dois grupos: aqueles cujo mRNA será analisado por Northern Blot (4 camundongos) e aqueles cuja análise será feita por Microarray (4 camundongos). A partir do pool dos mRNA de quatro camundongos submetidos ao fumo e de quatro camundongos do grupo controle de cada câmara será realizado o Microarray (de modo a serem feitos 3 experimentos de Microarray). O mesmo arranjo será feito para a análise de Northern Blot (de modo a serem feitos 3 experimentos de Northern Blot).

4.2 Métodos

4.2.1 modelo de exposição dos camundongos ao cigarro

Os camundongos (*Mus musculus*) selecionados para os experimentos serão separados em dois grupos e colocados em câmaras fechadas. Em um dos grupos será realizado a indução do fumo através de um modelo de exposição ao cigarro. O outro grupo constituirá um grupo controle, que será submetido às mesmas condições bióticas e abióticas, porém sem a indução do fumo.

O modelo de exposição ao cigarro é constituído de uma câmara de acrílico com capacidade para 8 camundongos. A câmara receberá fumaça de cigarro (50-100ml/min) e ar comprimido (5L/min) para manter uma concentração de monóxido de carbono entre 45-55 ppm no seu interior. Os camundongos serão expostos por um período de 2 horas por dia durante 30 dias. Após esse tempo, os animais serão sacrificados e seus pulmões isolados.

4.2.2 sacrifício e isolamento dos pulmões dos camundongos

Para a coleta de material dos animais, os camundongos serão apanhados pela metade da cauda e serão colocados rapidamente em uma cuba grande forrada com jornal contendo um pouco de éter etílico. Rapidamente colocar-se-á um chumaço de algodão embebido no mesmo éter, e a cuba será rapidamente tampada. Quando adormecer, o camundongo será retirado e colocado em decúbito dorsal sobre a placa de parafina. As patas serão presas com alfinetes e será colocada uma pequena cuba com éter sobre o focinho do animal para manter a anestesia. No campo cirúrgico, região torácica, a pele do animal será molhada com álcool para diminuir o volume dos pelos. Com o auxílio de uma pinça anatômica, a região torácica será tensionada e uma incisão vertical, cortando só a pele, será feita com uma tesoura reta. A pele será afastada até a altura dos membros e será presa por alfinetes. A superfície muscular será molhada com solução salina. A região torácica será aberta provocando a morte do animal e o pulmão será retirado com o auxílio de uma pinça hemostática (RIBEIRO 2000).

4.2.3 extração do mRNA e Microarray

Logo em seguida, será extraído o mRNA total das células pulmonares de todos os animais seguindo o protocolo: Método de extração por isotiocianato de guanidina e fenol-clorofórmio (Tabela1). O RNA extraído do grupo controle e do grupo induzido ao fumo será "marcado" com fluorocromos e analisados em um DNA-Chip de *Mus musculus* (adquirido comercialmente) pela técnica do Microarray, no qual será gerada uma imagem de hibridação, obtida por meio de leitores (*scanners*) a laser.

4.2.4 comprovação dos resultados do Microarray através de Northern Blot

Os resultados obtidos a partir do Microarray serão submetidos a comprovação posteriormente através de novos experimentos utilizando a técnica de Northern Blot. Primeiramente, quantidades iguais da amostra serão submetidas a uma eletroforese em gel de agarose/formaldeído (desnaturante). Em seguida, as bandas serão transferidas por capilaridade para uma membrana de nylon. Esta será incubada com sondas específicas (marcadas radioativamente através de um kit comercial) para os genes que exibiram padrões alterados de expressão (detectados a partir do microarray). O resultado será analisado, comparando-se as bandas aparentes resultantes da hibridação com as sondas, pelo peso molecular (a partir de um padrão de peso molecular) e espessura da banda, revelando diferenças ou não da expressão gênica entre os animais submetidos ao fumo induzido e os animais constituintes do grupo controle. Os resultados obtidos nos experimentos de Northern Blot serão comparados com aqueles obtidos pela análise por Microarray, esperando-se a comprovação dos mesmos.

**Extração de mRNA total de amostras
(MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA E FENOL-CLOROFÓRMIO)**

1. SOLUÇÕES

A) Tampão de Lise

		p/ 1L (Milli-Q □ q.s.p.)
Citrato de Sódio	42mM	12.35 g
N-lauroyl sarcosine	0.83%	2.435 g
□-mercaptanoetanol	0.2mM	140 □L

B) Solução Isotiocianato de Guanidina

		p/ 1L (Milli-Q □ q.s.p.)
Isotiocianato de Guanidina	6M	708.96 g
Acetato de Potássio	2M	196.28 g

C) Tampão Denaturante

33mL Solução A + 35.27mL Solução B

Aquecer a 65°C para a dissolução eficiente dos compostos. Manter a 4°C.

D) Solução de Acetato de Sódio 2M pH 4.0

196,28g de NaAc + 1000 mL água deionizada q.s.p.

Corrigir o pH para 4.0 em temperatura ambiente, com HCl concentrado.

Manter a 4°C

I) Isolamento a partir de amostras de tecidos sólidos

1. Num tubo estéril de 50mL em banho de gelo por no mínimo 5 minutos, pipetar 12mL do Tampão Denaturante (C) pré-resfriado a 4°C para cada grama de tecido utilizado.
2. Homogeneizar a amostra com um bastão de vidro estéril.
3. Homogeneizar por inversão
4. Realizar o protocolo de extração

PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

1. Adicionar 1,2mL de Acetato de Sódio 2M pH 4.0 a 4°C. Agitar vigorosamente por inversão.
2. Adicionar a cada tubo 12mL de Fenol-Clorofórmio a 4°C. Homogeneizar por inversão e vortexar por 10 segundos. Deixar em banho de gelo por 15 minutos.
3. Transferir a mistura a outro tubo de 50mL e centrifugar a 10.000xg por 20 minutos a 4°C.
4. **Remover cuidadosamente a fase superior da solução e transferi-la para outro tubo de 50mL.**

PRECIPITAÇÃO DO RNA EXTRAÍDO

1. Adicionar Isopropanol a 4°C na proporção 1:1 (v/v). Incubar a -20°C por 15 minutos. Para resultados otimizados, a precipitação pode seguir *overnight*.
2. Centrifugar por 10.000xg por 15 minutos a 4°C.
3. Remover o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 10mL de Etanol 75% gelado (4°C). Dependendo da coloração do *pellet*, que deve variar do branco ao incolor, este passo deve ser realizado. Por exemplo, *pellets* amarelados indicam presença de restos celulares, que devem ser removidos por essa precipitação com Etanol 75%.
4. Secar os tubos invertidos sobre papel absorvente em fluxo laminar por no máximo 10 minutos.
5. Ressuspender o material em 1mL de água deionizada estéril a 4°C e armazenar a -20°C. Para estocagem por longos períodos, recomenda-se a dissolução do *pellet* em Acetato de Sódio 0.25M, pH 5.0 e adicionar 2.5 volumes de Etanol absoluto. Manter a -70°C.

Tabela 1

5 Cronograma

<i>PROCEDIMENTOS</i>	<i>TEMPO ESTIMADO</i>
Maturação dos animais	60 dias
Submissão dos animais ao fumo	30 dias
Obtenção do tecido pulmonar dos animais e extração de mRNA	30 dias
Microarray	60 dias
Northern Blot	60 dias
Análise dos resultados	30 dias

O tempo total estimado para a conclusão do projeto é de 9 meses ou 270 dias.

6 Orçamento

<i>ITENS</i>	<i>CUSTO POR UNIDADE</i>	<i>NUMERO DE UNIDADES</i>	<i>CUSTO TOTAL</i>
Câmara de acrílico	R\$45,00	6	R\$270,00
Camundongos	R\$ 3,06	48	R\$146,88
Manutenção dos camundongos			R\$2.000,00
DNA – chip	R\$6.000,00	3	R\$18.000,00
Cilindro de ar comprimido	R\$499,90	1	R\$499,90
Maço de Cigarros	R\$3,25	60	R\$195,00
Kit de marcação radioativa de sondas para Northern Blot	R\$500,00	1	R\$500,00
			TOTAL: R\$21.611,78

7 Análise de resultados

Será observado pela técnica do microarray se há ou não diferença na expressão gênica entre os camundongos que foram induzidos ao fumo e entre os camundongos do grupo controle. A diferença de expressão será observada em alguns genes através da observação do CHIP com mRNA marcados por sondas. Os pontos nos quais for observada alguma diferença entre as ligações de mRNA do grupo controle e grupo “fumante” serão considerados genes possivelmente afetados pelo tabagismo. A partir daí é possível inferir em quais genes o tabaco teria influência sobre a expressão. Com base nos genes que apresentarem diferença de expressão, serão realizados experimentos de Northern Blot para verificação dos resultados e uma possível quantificação da diferença de expressão apresentada. Se não for observada nenhuma mudança de expressão gênica entre os dois grupos será considerado que o tabaco não influencia a expressão e que seus efeitos patogênicos se devem a outros fatores.

8 Referências Bibliográficas

Biblioteca virtual em saúde <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=419262&indexSearch=ID> acessado no dia 11 de junho de 2008

Peto, R., Lopes, A. D., Boreham, J., Thun, M., Mortality From Smoking in Developed Countries 1950-2000 New York, Oxford University Press, 1994. 103, 553 p.

Zhang H, Cai B (2003) The impact of tobacco on lung health in China, *Respirology* 8 (1) , 17–21 doi:10.1046/j.1440-1843.2003.00433.x.

Sridhar, S., Schembri, F., Zeskind, J., Shah, V., Gustafson, A. M., Steiling, K., Liu, G., Dumas, Y. M., Zhang X., Brody, J. S., Lenburg M. E., Spira, A Smoking-induced

gene expression changes in the bronchial airway are reflected in nasal and buccal epithelium *BMC Genomics* 2008, **9**:259doi:10.1186/1471-2164-9-259

Saber viver webquest: para uma vida sem fumo
http://www.minerva.uevora.pt/publicar/wq_fumar/doencas.htm acessado no dia 11 de junho de 2008

Brasil unido contra o tabaco <http://www.consciencia.net/brasil/tabagismo.html> acessado no dia 11 de junho de 2008

Ezzati M, Lopes, A. D., Regional, disease specific patterns of smoking-attributable mortality in 2000 *Tobacco Control* 2004;**13**:388-395

WWI-Worldwatch Institute / UMA-Universidade Livre da Mata Atlântica
<http://www.uma.org.br/artigos/017.html> acessado no dia 11 de junho de 2008

Boeira, S., Johns, P. Indústria de Tabaco *versus* Organização Mundial de Saúde: um confronto histórico entre redes sociais de *stakeholders* 2006B

INCA: Instituto Nacional Contra o Câncer
<http://www.inca.gov.br/tabagismo/dadosnum/brasil.htm> acessado no dia 15 de junho de 2008

Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer - INCA. O controle do tabagismo no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2004.

RIBEIRO, M. G. ; LIMA, S. R. . Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia. 1. ed. Belo Horizonte: SEGRAC - Editora e Gráfica LTDA, 2000. v. 1. 106 p.