

REDUÇÃO DO USO DE ANIMAIS ATRAVÉS DA BIOINFORMÁTICA: TÉCNICAS *IN-SILICO* APONTAM ALVOS MOLECULARES
(REDUCTION IN THE UTILIZATION OF ANIMALS THROUGH BIOINFORMATICS: *IN-SILICO* TECHNIQUES POINT TOWARDS MOLECULAR TARGETS)

Christina Pacheco; Stela Mirla da Silva Felipe; Francisco Sérgio Vasconcelos Filho; Luiz Henrique Pontes dos Santos; Felipe Carmo de Moura; Juliana Osório Alves; Adriano Nogueira de Queiroz; Vânia Marilande Ceccatto*

Universidade Estadual do Ceará

ABSTRACT

Model animals are indispensable in the advancement of life sciences. Computational analyses can save time and reduce the number of animals needed. Bioinformatics offer tools that support research through *in-silico* evaluations. Our aim was to study the function of exercise-linked genes, focusing on disease pathways, envisaging the discovery of new molecular targets for the use in animal model studies. This research was part of two projects approved by the local Ethics Committee (CEUA/UECE) in 04/2014 (1592060/2014) and 07/2015 (2542310/2015). Human genes linked to physical exercise were classified by the pathways using the enrichment tool *Enrichnet*. Statistical analyses (ANOVA) were used using the Fisher test (q-value). Strong correlations were found with neurodegenerative, cardiovascular and immunologic diseases. Within neurodegenerative diseases, physical exercise was found to be linked to Parkinson's (q-value 1.6×10^{-17}), Alzheimer's (q-value 3.9×10^{-16}) and Huntington disease (q-value 1.9×10^{-15}). Within cardiovascular diseases linked to exercise there is hypertrophic cardiomyopathy (q-value 8.5×10^{-15}). A large number of genes linked to exercise were found to participate in disease linked metabolic pathways. Concluding, after evaluating genes linked to physical exercise and disease pathways, new molecular targets for the use in model animal studies were revealed.

KEYWORDS: physical exercise-disease interactions; bioinformatics; molecular targets

INTRODUÇÃO

O avanço das ciências da vida tem, como ferramenta indispensável, o uso de animais modelo. Observações anatômicas vêm sendo realizadas desde 500 AC, quando animais foram dissecados para investigações científicas (Paixão & Schramm, 1999). A experimentação animal levou a descobertas nas ciências básicas e aplicadas, culminando no aprofundamento do entendimento sobre os seres vivos e no desenvolvimento de novos tratamentos. Dentre os cientistas, há uma opinião hegemônica que a ciência necessita de animais, mas há também diversas críticas (Paixão & Schramm, 1999). Para diminuir o uso de animais, foram propostos 3 Rs: reposição, redução e refinamento.

O termo Reposição refere-se à mudança ou substituição na escolha dos organismos modelo. Redução culmina na redução do número de animais. Refinamento remete à minimização

do desconforto ou sofrimento das cobaias (Russel & Burch, 1959).

Diversas metodologias foram sugeridas para minimizar o uso de animais em pesquisas científicas. Dentre elas estão simulações computacionais, que auxiliam no entendimento dos sistemas biológicos, no desenvolvimento de novos fármacos e na predição da toxicidade, dentre outros fins (Doke & Dhawale, 2015). Porém, alternativas ao uso de animais nas pesquisas não os substituem por conta do alto grau de complexidade dos seres vivos (The Royal Society, 2015). Ensaios prévios computacionais poupam tempo nas pesquisas e reduzem o número de animais necessários, já que a triagem inicial ocorre *in-silico*.

O exercício altera a expressão gênica, sendo um fator comportamental com resposta sistêmica. Sua prática tem demonstrado resultados na prevenção e no tratamento não-farmacológico de diversas doenças. Estudos de biologia molecular têm revelado grandes listas de genes diferencialmente expressos ligados ao

*Autor correspondência: vania.ceccatto@uece.br
Resumo em Português disponível no Suplemento

exercício físico em humanos. O catálogo Fitnoma reuniu mais de 5000 genes ligados ao exercício físico em humanos. A avaliação funcional desse conjunto gênico levou a novas perguntas, uma delas sendo a atuação do exercício físico na regulação das vias metabólicas de doenças. O objetivo foi avaliar a função dos genes ligados ao exercício físico, focando nas vias de doenças, com o intuito de ampliar o leque de alvos moleculares para estudos com animais modelo.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto “Genoma funcional do exercício de endurance em ratos” foi aprovado pelo Comitê de Ética Para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará em 25/04/2014 (processo 1592060/2014). O presente trabalho também faz parte do projeto “Alterações comportamentais neuroquímicas e morfológicas de áreas relacionadas à memória de ratos induzidos ao Alzheimer” aprovado em 07/2015 (processo 2542310/2015).

Baseando-se no catálogo Fitnoma, a análise de enriquecimento foi feita usando o *EnrichNet* (Glaab et al., 2012) para verificar as vias metabólicas ligadas ao conjunto gênico, focando nas vias do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Kanehisa et al., 2012) ligadas a doenças. Análises estatísticas (ANOVA) foram realizadas usando o teste de Fisher (q-valor). O resultado foi avaliado na busca de alvos moleculares na interseção exercício-doença para o uso em experimentos com modelos animais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Simulações computacionais poder ser usadas nas ciências da vida para aprofundar o entendimento sobre os sistemas biológicos (Doke & Dhawale, 2015). Genes ligados ao exercício físico em humanos mostraram forte ligação com vias de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e imunológicas, como pode ser visto na tabela 01. Dentre as doenças neurodegenerativas, foram encontradas as mais fortes correlações, com o exercício físico ligado a 87 dos 124 genes da via do mal de Parkinson ($q = 1,6 \times 10^{-17}$), a 101 dos 159 genes envolvidos nos mecanismos moleculares do mal de Alzheimer ($q = 3,9 \times 10^{-16}$) e a 106 dos 173 genes na via da doença de Huntington ($q = 1,9 \times 10^{-15}$) (Tabela 01). Um alvo molecular presente em 2 vias, Alzheimer

e Parkinson, é o gene *NDUFB3* (*NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex*), cuja expressão é induzida pelo exercício (até +2,4X) (Stepto et al., 2009). *PPARGC1A* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha*) tem a sua expressão suprimida nos pacientes com Huntington (McGill & Beal, 2006) e induzida pelo exercício (em até 9X mais) (Liu et al., 2010; Egan & Zierath, 2013), o que dá uma base molecular para estudos futuros sobre o uso do exercício como tratamento ou método preventivo dessas doenças. As vias de doenças cardiovasculares encontradas ligadas ao exercício físico foram miocardite viral, com 40 dos 60 genes relacionados a esse estímulo ($q = 8,5 \times 10^{-5}$) e cardiomiopatia hipertrófica, com mais da metade dos genes da via inclusos (45 de 82, $q = 8,5 \times 10^{-5}$). Um gene alvo na ligação entre exercício físico e cardiomiopatia hipertrófica é o *PRKAG2* (*protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit*), com sua expressão após o exercício aumentada em até 4,79 vezes (Liu et al., 2010).

Considerando os 3 Rs, reposição, redução e refinamento (Russel & Burch, 1959), os resultados da presente pesquisa podem auxiliar no aspecto redução, direcionando as buscas pela atuação do exercício físico nas vias de doenças e o desenho de pesquisas de biologia molecular do exercício com animais modelo.

CONCLUSÕES

Novos alvos moleculares para o uso em estudos com animais modelo na interação exercício/doença foram revelados, principalmente ligando o exercício físico às vias moleculares de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e imunológicas. Estudos futuros podem investigar essas ligações em animais modelo induzidos às doenças em questão que passem por um treinamento físico de um modo mais focado.

AGRADECIMENTOS

Pelo auxílio financeiro, agradecemos ao CNPq, à FUNCAP e à CAPES. Pela infraestrutura disponibilizada, agradecemos ao LABIEX, à RENORBIO, ao ISCB e à UECE. Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Tabela 01. Ligação entre genes ligados ao exercício físico e vias moleculares de doenças

Categoria	Via KEGG (ID)	Genes do exercício / Total da via	Regulação (Up/Down)	Lista de genes relacionados ao exercício físico e às vias moleculares das patologias
Doenças cardiovasculares	Miocardite viral (hsa05416)	40/70	Up	DAG1, DMD, EIF4G1, FYN, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-E, ICAM1, ITGAL, ITGB2, MYH1, MYH2, MYH3, MYH7, MYH8, MYH9, MYH10, CYCS, PRF1, RAC1, CCND1, ACTB, BID, SGCA, SGCB, SGCG, ACTG1, CASP3, CASP8, CAV1, EIF4G3, CD86, CD40
	Cardiomiopatia hipertrófica (hsa05410)	45/82	Up	DAG1, ACE, DMD, IGF1, IL6, ITGA6, ITGA1, ITGA5, ITGA9, ITGB1, ITGB4, ITGB5, ITGB6, LMNA, MYH7, MYL2, MYL3, PRKAG2, PRKAG3, PRKAA1, PRKAA2, PRKAB2, CACNG8, CACNG6, ACTB, RYR2, SGCA, SGCB, SGCG, ACTC1, TGFB1, ACTG1, TNF, TNNT3, TNNT2, TPM1, TPM2, TPM4, TTN, CACNA1C, CACNA1S, CACNA2D1, CACNB1, CACNB3, ITGA10
Doenças imunes	Rejeição alográfica (has05330)	20/37	Up	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-E, IFNG, IL2, FASLG, IL4, IL5, IL10, PRF1, TNF, CD86, CD40
Doenças neurodegenerativas	Mal de Parkinson (hsa05012)	87/124	Up	ATP5H, UQCR11, COX4I1, COX5B, COX6A1, COX6B1, COX6C, COX7A2, COX7B, COX7C, COX8A, CYC1, UQCRQ, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, UQCR10, NDUFS7, UQCRH, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-CYB, MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5, MT-ND6, NDUFA1, NDUFA3, NDUFA4, NDUFA6, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFAB1, NDUFB1, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB10, NDUFC1, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFV1, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS8, NDUFV3, ATP5A1, ATP5B, PARK2, ATP5C1, ATP5E, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G3, ATP5J, ATP5O, CYCS, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, PINK1, SLC18A2, UBA7, UBE2G1, UBE2L3, UCHL1, UQCRB, UQCRC1, UQCRC2, UQCRFS1, VDAC2, VDAC3, CASP3, COX4I2, UBE2L6, COX5A, SNCAIP
	Mal de Alzheimer (hsa05010)	100/159	Up	ATP5H, UQCR11, COX4I1, COX5B, COX6A1, COX6B1, COX6C, COX7A2, COX7B, COX7C, COX8A, CYC1, CALML6, PLCB1, BACE2, UQCRQ, GRIN2C, GSK3B, UQCR10, HSD17B10, IDE, APOE, APP, IL1B, ITPR1, NDUFS7, LPL, LRP1, UQCRH, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-CYB, NDUFA1, NDUFA3, NDUFA4, NDUFA6, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFAB1, NDUFB1, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB10, NDUFC1, NDUFS1,

				NDUFS2, NDUFS3, NDUFV1, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS8, NDUFV3, ATP2A1, ATP2A3, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5E, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G3, ATP5J, PLCB2, PLCB3, ATP5O, CYCS, PPP3CA, PPP3CB, PPP3R1, PSENE1, PSENE2, RYR3, BID, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, TNF, UQCRB, UQCRC1, UQCRC2, UQCRFS1, CACNA1C, CACNA1S, CALM1, CAPN1, CAPN2, CASP3, CASP8, COX4I2, CDK5R1, COX5A
	Doença de Huntington (hsa05016)	106/173	Up	DNAL4, ATP5H, PPARGC1A, UQCR11, AP2S1, CLTA, CLTB, COX4I1, COX5B, COX6A1, COX6B1, COX6C, COX7A2, COX7B, COX7C, COX8A, CREB1, CREBBP, CYC1, EP300, RCOR1, PLCB1, UQCRQ, SLC25A4, SLC25A5, SLC25A6, UQCR10, HDAC1, HDAC2, HIP1, ITPR1, NDUFS7, UQCRH, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-CYB, NDUFA1, NDUFA3, NDUFA4, NDUFA6, NDUFA8, NDUFA9, NDUFA10, NDUFAB1, NDUFB1, NDUFB2, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB10, NDUFC1, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFV1, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, NDUFS8, NDUFV3, NRF1, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, DCTN4, ATP5E, ATP5F1, ATP5G1, ATP5G3, ATP5J, PLCB2, PLCB3, ATP5O, CYCS, POLR2G, POLR2L, PPARG, BAX, BDNF, SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SOD2, TAF4, TAF4B, TBP, TFAM, TGM2, UCP1, UQCRB, UQCRC1, UQCRC2, UQCRFS1, VDAC2, VDAC3, DNALI1, CASP3, CASP8, COX4I2, CREB3L1, COX5A

REFERÊNCIAS

DOKE, S. K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, p. 223-229. 2015.

EGAN, B.; ZIERATH, J.R. Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation. *Cell Metabolism*, v. 17, n.2. p. 162-184. 2013.

GLAAB, E.; BAUDOT, A.; KRASNOGOR, N.; SCHNEIDER, R.; VALENCIA A. EnrichNet: network-based gene set enrichment analysis. *Bioinformatics*. v. 28, n.18, p. 451-457. 2012.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; SATO, Y.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res*, v. 40, p. D109-D114. 2012.

LIU, D.; SARTOR, M. A.; NADER, G. A.; GUTMANN, L.; TREUTELAAR, M. K.; PISTILLI, E. E.; IGLAYREGER, H. B.; BURANT, C. F.; HOFFMAN, E. P.; GORDON, P. M. Skeletal muscle gene expression in response to resistance exercise: sex specific regulation. *BMC Genomics*, v. 11, p. 659. 2010.

MCGILL, J.K.; BEAL, M. F. PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease? *Cell*, v. 127, n.3, p. 465-468. 2006.

PAIXÃO, R. L.; SCHRAMM, F. R. Ethics and animal experimentation: what is debated? *Cad Saúde Pública*, v. 15 n.Sup1, p.99-110. 1999.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. London: Universities Federation for Animal Welfare, 1959.

STEPTO, N. K.; COFFEY, V.G.; CAREY, A.; PONNAMPALAM, A.; CANNY, B.; POWELL, D.; HAWLEY, J. Global gene expression in skeletal muscle from well-trained strength and endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc*, v. 41, n.3, p. 546. 2009.

THE ROYAL SOCIETY. The use of non-human animals in research: a guide for scientists. Acesso em 20 de Agosto de 2015. Disponível em: https://royalsociety.org/~media/Royal_Society_Content/policy/publications/2004/9726.pdf.