



O PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) PODE SER UM MODELO ANIMAL ADEQUADO PARA A DESCOBERTA DE INIBIDORES DO TRANSPORTADOR DE SEROTONINA HUMANA?

VITÓRIA RÉGIA DO AMARAL RODRIGUES

RESUMO

O estudo aborda as fases pré-clínica e clínica no desenvolvimento de medicamentos, destacando o uso tradicional de roedores em pesquisas médicas. No entanto, o zebrafish (*Danio rerio*) é apresentado como um modelo animal alternativo devido a suas características vantajosas (genéticas, fisiológicas e econômicas). O foco é a análise do zebrafish como modelo para inibidores de serotonina, utilizando ferramentas bioinformáticas para comparar as sequências moleculares do transportador de serotonina em humanos e zebrafish. Foram utilizados os bancos de dados de bioinformática PDB (Protein Data Bank) e NCBI (National Center for Biotechnology Information) para obter as sequências FASTA do transportador de serotonina das espécies em questão. O alinhamento dessas sequências foi realizado utilizando o Clustal Omega, uma ferramenta acessível no European Bioinformatics Institute (EMBL). Posteriormente, uma análise estrutural do ligante foi conduzida no PDBsum, fornecendo informações sobre a estrutura 3D depositada no PDB. A ferramenta LIGPLOT foi empregada para identificar as interações entre o ligante e os aminoácidos da proteína. Os resultados revelam uma alta similaridade entre as sequências, com variações em quatro aminoácidos, consideradas conservativas, sugerindo uma funcionalidade equivalente. Conclui-se que o zebrafish é um modelo viável para estudos farmacológicos, especialmente para inibidores de serotonina, ressaltando a importância das ferramentas bioinformáticas na pesquisa e seu potencial impacto no desenvolvimento futuro de fármacos. Ademais, proporciona insights valiosos sobre a aplicabilidade do zebrafish como modelo experimental, potencialmente influenciando futuros desenvolvimentos na descoberta de fármacos.

Palavras-chave: Bioinformática, Genética, Saúde humana, Espécie exótica, Biotecnologia.

1 INTRODUÇÃO

Para a descoberta de novos medicamentos e vacinas, existem duas etapas experimentais importantes, a fase pré-clínica envolve os primeiros passos para o desenvolvimento de uma nova vacina ou medicamento que, segundo a SBPPC (Sociedade Brasileira de Profissionais em Pesquisa Clínica), abrange os testes em células e testes em modelos animais (não humanos) para, assim, testar a eficácia do que está sendo produzido. De acordo com o Manual sobre ética em pesquisa com seres humanos, da Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, do ano de 2010, a pesquisa pré-clínica deve gerar informações que permitam justificar a realização de trabalhos de pesquisa em seres humanos, onde os resultados pré-clínicos devem mostrar a relevância dos dados, possíveis aplicações terapêuticas e prever a ocorrência de alguns riscos decorrentes de seu uso. Após o cumprimento da fase pré-clínica e resultados favoráveis, parte-se para a próxima fase, a fase clínica, onde o principal objetivo é testar a eficiência do novo fármaco, seja vacina ou medicamento, em seres humanos diretamente, onde é dividida em quatro partes para avaliar a segurança e a eficácia do produto (INCA, 2021).

A maioria das pesquisas médicas, necessita de modelos animais para ampliar o conhecimento sobre as causas e consequências das doenças humanas, possibilitando com isso novos testes e terapias inovadoras. O modelo animal inserido no contexto dos estudos pré-clínicos está ligado à fase antes do teste em seres humanos, quando são testados a eficácia do fármaco *in vitro* e em animais não humanos. A escolha do animal para este teste deve basear-se nas semelhanças entre a espécie humana e a não humana, onde é importante avaliar a fisiologia e a patofisiologia (SUZUKI, 2009). Roedores, como ratos e camundongos, são os mais usados em estudos experimentais justamente por possuírem essas semelhanças com *Homo sapiens* (SILVEIRA, 2012). Tendo em vista que um modelo é um objeto de imitação, cuja finalidade é representar algo baseado nas suas semelhanças (SALÉN, 1995), segundo o levantamento de dados de Fagundes (2004), os animais não humanos mais usados como modelos nos estudos pré-clínicos são ratos, camundongos, coelhos, cães, suínos e primatas. Sendo que o número de estudos relacionados a cada espécie muda de acordo com a base de dados e o local de origem do estudo.

O *D. rerio* é um vertebrado que foi introduzido com louvor nas pesquisas científicas de desenvolvimento de novos fármacos, constituindo um excelente modelo experimental para estudo de diversas doenças e testar novos agentes terapêuticos (COUTO SANTOS, 2020). A espécie em questão, conhecido também como zebrafish, é um peixe que tem um desenvolvimento rápido, é pequeno, possui imunidade inata, manipulável geneticamente, com fertilização externa, seu genoma é sequenciado com homologia com mamíferos; possui transparência, permitindo observação dos seus órgãos internamente, bem como seu baixo custo financeiro, tornando-o um animal ideal para realização de estudos na fase pré-clínica de desenvolvimento de fármacos, tomando, assim, possivelmente, o lugar dos roedores. (SILVEIRA, 2012; COUTO SANTOS, 2020).

A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor que conduz a informações de um neurônio para outro. Tem influência sobre atividades psíquicas, inibindo ou estimulando funções cerebrais (FEIJÓ et al. 2011). O transportador de serotonina, quando inibido, quando aumenta a estimulação pós-sináptica da serotonina, acaba causando a diminuição da ingestão de alimentos e o ganho de peso (FEIJÓ et al. 2011). Além de estar envolvida na modulação da ingestão alimentar, causando transtornos alimentares como anorexia, a concentração de serotonina pode estar relacionada a alterações de comportamento e humor, ansiedade, agressividade, depressão, sono, fadiga (ROSSI, 2004).

Partindo do pressuposto que as ferramentas de bioinformática são ferramentas computacionais, matemáticas e estatísticas que ajudam na expansão de formas de uso de dados biológicos, bioquímicos e biofísicos, elas possibilitam comparações entre as sequências desejadas das espécies estudadas e, assim, observar maior ou menor grau de semelhança com as regiões de similaridades (THAMPI, 2009). Objetivou-se com esse estudo, analisar se o Zebrafish seria um bom animal modelo no estudo sobre inibidores de serotonina humana. Ademais, as ferramentas da informática podem ser úteis para comparação das sequências moleculares entre o *D. rerio* e o *H. sapiens* e, assim, observar suas similaridades, possibilitando a veracidade ou não de um potencial modelo no estudo de fármacos inibidores do transportador de serotonina em seres humanos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi feito o uso dos bancos de dados de bioinformática PDB (Protein Data Bank) e NCBI (National Center for Biotechnology Information) para obtenção da sequência FASTA do alvo biológico do presente estudo para as espécies de *Danio rerio* e *Homo sapiens*. Bem como foi realizado o alinhamento destas sequências a partir do Clustal Omega, ferramenta disponível para acesso livre no European Bioinformatics Institute (EMBL). Posteriormente foi-se realizado uma análise estrutural do ligante no PDBsum que é um banco de dados que fornece

informações de cada estrutura 3D depositada no PDB e, a partir do LIGPLOT, foi possível a obtenção das moléculas que fazem interação com o ligante e, assim, possibilitando uma investigação mais minuciosa em relação ao uso do *D. rerio* como modelo para este estudo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do PDB (Protein Data Bank) e NCBI (National Center for Biotechnology Information), foi possível a obtenção das sequências FASTA do transportador de serotonina do *D. rerio* e *H. sapiens*, como segue abaixo:

<https://www.rcsb.org/entry/5i74/display>

> Transportador de serotonina - dependente de sódio [*Homo sapiens*] (5I74)

GSQGERETWGKKVDFLLSVIGYAVDLGNVWRFYPYICAQNGGGAFLLPYTIMAIFGGI
PLFY
MELALGQYHRNGCISIWKRKICPIFKGIGYAICIAFYIASYYNTIMAWALYYLISSFTDQ
LPW
TSCKNSWNTGNCTNYFSEDNITWTLHSTSPAEEFYTRHVLQIHRSKGLQDLGGISWQ
LALC
IMLIFTVIYFSIWKGVKTSKGKVVWVTATFPYIALSVLLVRGATLPGAWRGVLFYLPKN
WQ
KLLETGVWIDAAAQIFFSLGPGFGVLLAFASYNKFNNNCYQDALVTSVVNCMTSFVS
GFVI
FTVLGYMAEMRNEDVSEVAKDAGPSLLFITYAEAIAANMPASTFFAIIFFLMLITLGLDS
SFA
GLEGVITAVLDEFPHVWAKRRERFVLAVVITCFFGSLVTLTFGGAYVVKLLEEYATG
PAV
LTVALIEAVAVSWFYGITQFCRDVKEMLGFSFGWFWRICWVAISPLFLLFIASFLMSP
PQL RLFQYNYPYWSIILGYAIGTSSFCIPTYIAYRLIITPGTFKERIISITPETPTLVPR

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABB88575.1?report=fasta>

> Transportador de serotonina a [*Danio rerio*]

MDMKESMMMNQEYGGEEQKVPESQENGRLVVDSVPEKDQKSGSGPGQVSNGYRS
TSPQ
SPKEGAGTGTDRVNTPGTFRTL VVQQTS LDPPRETWSKKMDFLLSVIGYAVDLGNV
WRF
YICYQNGGGAFLLPYLLMAVFGGVPLFY MELALGQFHRSGCISIWKHVCPIFKGIGFA
ICII
ALYIAFYNTIMAWALYYLLSSFRATLPWTTCNNRWNTPNCTHYLSTDNLVSWTNN
SISP
AEEFYVRQVLQVHLSPLHQLGWVSWQLALCLFIFTVVYFSIWKGVKTSKGKVVWVT
ATF
PYLVLLILLIRGATLPGAWRGVV FYLPDWKKLLTTTVWLDAAAQIFFSLGPGFGVL
LAFA
SYNPFHNNCYKDALITSSVNCLTSFLSGFVIFTVLGYMAEMRQQGVETVAKDAGPSL
LFIY
AEAIAANMPAATFFAIIFFLMIIMLGLDSTFAGLEGVITAMLDEFPHLLARRREWFVLGL
VCV
CYLGALSTLTYGGAFVVKLFEEYATGPAVITVVFLVIAVSWFYGTTRFCNDVQLML
GFA
PGLFWRVCWIAICPCFLLFIIVSFLAFPPEVKLFDYLYPFWTTVLGYCIGVSSFCVPSY
MVY HLVTTKGTFQQRLLKGITPEAPGSSGPQRDTIVITNAV

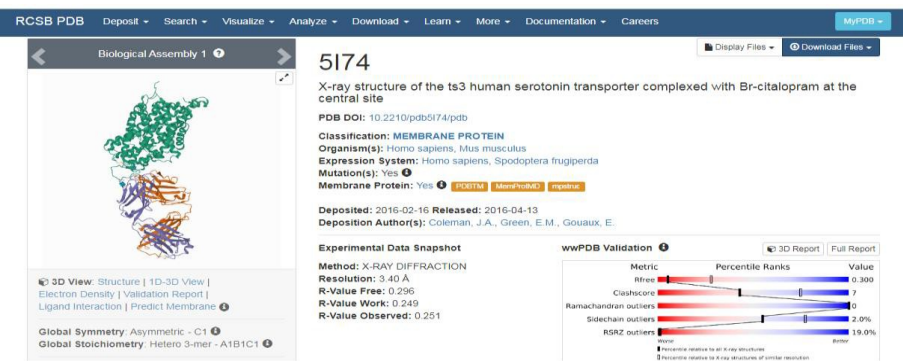
Foi usado o Clustal Omega para realizar o alinhamento da sequência primária do alvo biológico do presente estudo, que é o Transportador de serotonina do *D. rerio*, com a sequência FASTA do mesmo alvo com estrutura tridimensional depositada no PDB, que é o 5I74 (Figura 1), o grau de alinhamento entre estas sequências, a do peixe e a do ser humano, é bem alta, onde pode ser observado que muitos aminoácidos estão conservados. A estrutura buscada no PDB trata-se de uma estrutura de raios-X do transportador de serotonina humano ts3 complexado com Br-citalopram no local central, cujo método experimental adotado para obtenção da estrutura tridimensional foi a difração de raios x (Figura 2).

Fig. 1: Alinhamento das sequências FASTA do transportador de serotonina se *D. rerio* e *H.*



sapiens, obtido a partir do Clustal Omega.

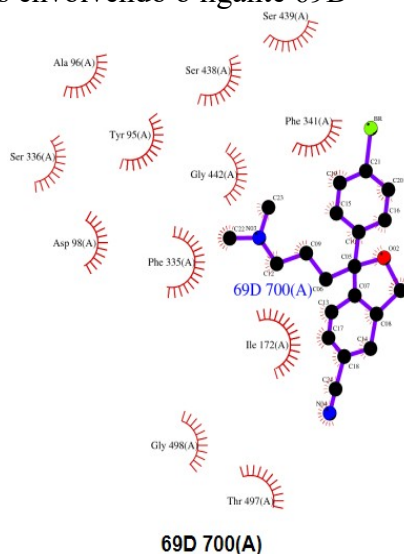
Fig. 2: Estrutura 5I74 encontrada e analisada a partir do PDB



Foi observado na imagem 3D obtida no PDB que o sítio ativo do cristal 5I74 é composto pelo ligante 69D, ou seja, “(1s)-1-(4-Bromophenyl)-1-[3-(Dimethylamino) propyl]-1,3-Dihydro-2-Benzofuran-5-Carbonitrile”, cuja fórmula é C₂₀H₂₁BrN₂O. A partir da estrutura do LIGPLOT, pôde-se observar que a molécula 69D faz interação com esses aminoácidos da proteína, Alanina (Ala/A) 96, Serina (Ser/S) 336, S 438, S439, Tirosina (Tyr/Y) 95, Y

497, Glicina (Gly/G) 442, G 498, Fenilalanina (Phe/F) 335, F 341, Asparagina (Asp/N) 98, Isoleucina (Ile/I) 172, assim como pode ser observado no *PDBsum* (Figura 3).

Fig. 3: LIGPLOT de interações envolvendo o ligante 69D



Como pode ser observado na figura 3, estão os 12 aminoácidos do sítio ativo que estão presentes no ligante. Faz-se necessário saber se estes aminoácidos estão presentes em ambas sequências FASTA das espécies. Como pode ser observado abaixo, na sequência FASTA do *H. sapiens* estão presentes todos os 12 aminoácidos encontrados no sítio ativo do ligante da estrutura do transportador de serotonina humana (69D). Enquanto isso, quando observamos que, na sequência FASTA do *D. rerio*, há 4 aminoácidos que não ocorrem, são estes: Isoleucina 172, Glicina 442, Serina 438, Serina 439.

> Transportador de serotonina - dependente de sódio [*Homo sapiens*]

```
GSQGERETWGKKVDFLLSVIGYAVDLGNVWRFYPYICANGGGAFLLPYTIMAIFGGI
PLFY
MELALGQYHRNGCISIWKRKICPIFKGIGYAICIAFYIASYYNTIMAWALYYLISSFTDQ
LPW
TSCKNSWNTGNCTNYFSEDNITWTLHSTPAEEFYTRHVLQIHRSKGLQDLGGISWQLALC
IMLIFTVIYFSIWKGVKTSKGKVVWVTATFPYIALSVLLVRGATLPGAWRGVLFYLPKN
WQ
KLLETGVWIDAAAQIFSLGPGFGVLLAFASYNKFNNNCYQDALVTSVVCMTSFVS
GFVI
FTVLGYMAEMRNEDVSEVAKDAGPSLLFITYAEAIANMPASTFFAIFFLMLITLGLDS
SFA
GLEGVITAVLDEFPHVWAKRRERFVLAVVITCFFGSLVTLTFGGAYVVKLLEEYATG
PAV
LTVALIEAVAVSWFYGITQFCRDVKEMLGFSFGWFWRICWVAISPLFLLFIASFLMSP
PQL RLFQYNYPYWSIILGYAIGTSSFCIPTYIAYRLIITPGTFKERIISITPETPTLVPR
```

> Transportador de serotonina - a [*Danio rerio*]

```
MDMKESMMMNEQYGGEEQQKVPESQENGRLVVDSPVEKDQKSGSGPGQVSNGYRS
TSPQ
SPKEGAGTGTDRVNTPGTFRTLTVVQQTSLDPPRETWSKKMDFLLSVIGYAVDLGNV
```

DOI: 10.51189/conbiv2024/30306

4 CONCLUSÃO

Foi-se possível, através das ferramentas bioinformáticas disponíveis e aqui utilizadas, observar minuciosamente a possibilidade do *Danio rerio* servir como um animal modelo para o estudo e desenvolvimento de fármacos, mais especificamente de inibidores de serotonina humana. A partir dos dados obtidos, correlações desenvolvidas e análises realizadas, é possível concluir que esta espécie de peixe é um bom modelo animal (não humano) para pesquisas farmacológicas.

REFERÊNCIAS

A Sociedade Brasileira de Profissionais em Pesquisa Clínica (SBPPC). Disponível em: <https://www.sbppc.org.br/home>

CÓRDAS, T. A. Transtornos alimentares em discussão. Revista Brasileira de Psiquiatria, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 1-14, 2001.

Couto Santos, M. ., Santos Silva, E., Fernandes Menezes , A. M. ., Pimenta Banax Junqueira, L., & Da Silva Rodrigues, L. O. . (2020). ZEBRAFISH (Danio rerio): NOVO MODELO ANIMAL INTRODUZIDO COM ÊXITO NO CENÁRIO CIENTÍFICO. *Revista Multidisciplinar Em Saúde*, 1(1), 34. Recuperado de <https://editoraime.com.br/revistas/index.php/rem/article/view/119>

DOYLE, J.; BRYANT-WAUGH, R.— Epidemiology. In: Lask, B.; BryantWaugh R. (eds.). Anorexia Nervosa and Related Eating Disorders in Childhood and Adolescence. 2nd ed. Psychology Press, East Sussex, UK, p.41-61, 2000.

Fagundes, Djalma José; Taha, Murched Omar. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. 2004.

Fases de desenvolvimento de um novo medicamento. Instituto Nacional do Câncer. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos/fases-desenvolvimento-um-novo-medicamento>

Feijó, Fernanda de Matos; Bertoluci, Marcello Casaccia; Reis, Cíntia (2011). *Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão*. Revista da Associação Médica Brasileira, 57(1), 74–77. doi:10.1590/S0104-42302011000100020

Hirsch, Michael; J Birnbaum, MDRobert. Selective serotonin reuptake inhibitors: Pharmacology, administration, and side effects. 2018.

Manual sobre ética em pesquisa com seres humanos. Secretaria Municipal da Saúde. Comitê de Ética em Pesquisa. São Paulo: s.n., 2004. 2ª. Edição revista, 2010.

Rossi L, Tirapegui J. Implicações do Sistema Serotoninérgico no Exercício Físico. Arq Bras Endocrinol Metab. 2004; 48(2):227-33