

VALIDAÇÃO *IN SILICO* DE MODELO ANIMAL PARA O ESTUDO DE PROTEÍNAS NO CABELO HUMANO

G. C.Blanco, A.C.Fernandes, P.B.Braga e P.P.Favero

Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – UNIVAP Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, Brasil.
e-mail: favero@univap.br

Resumo: O uso de técnicas de alinhamento e distanciamento proporcional via banco de dados UniProtKB é usado para fornecer suporte adicional em caráter científico.

Existem muitos estudos experimentais envolvendo comparações de pelos de animais distintos com a fibra capilar humana. Sabe-se que as famílias de proteínas associadas à queratina (KAP) estão presentes em toda fibra capilar e também em pelos humanos e animais, sendo a maior responsável pela estrutura da fibra. As sequências de aminoácidos das proteínas de famílias KAP de alguns animais estão descritas no UniProtKB, porém é de grande importância uma validação da utilização destes dados no modelamento animal e também no uso experimental, pois, fornecem características únicas, e esta comparação pode não ser possível. Neste trabalho serão estudadas as Famílias KAP5-5 e KAP19-5 de diferentes animais.

Palavras-chave: KAP, alinhamento, distanciamento.

Abstract: Using alignment techniques and proportional spacing via UniProtKB database amino acids sequences are used to provide additional support for scientific studies. There are many experimental studies involving comparisons of the different animals with human hair fiber. It is known that the families of keratin-associated proteins (KAP) are present in the human's hair fiber and also in animal's ones, being responsible for the largest fiber structure. In order to animal application in experiments the computational validation is a very useful tool. In this context, we study the families KAP5-5 e KAP19-5 of hair for different animals analysis.

Keywords: KAP, alignment, spacing

Introdução

O cabelo ou o pelo é fortemente queratinizado e formado dentro do folículo. O crescimento do cabelo tem origem em células proliferativas situadas no bulbo.

Quando essas células saem do compartimento germinativo passam através da zona de queratinização, por conseguinte, ocorre a diferenciação destas células tornando-se então uma fibra.

Esta fibra é composta por cutícula, córtex, e ocasionalmente, medula. No córtex, os arranjos de filamentos intermediários de queratina (KIF) são observados no citoplasma das células corticais. Cada KIF tem cerca de 8-10 nm de diâmetro e está rodeado por um espaço amorfo chamado matriz.

Os principais componentes estruturais da fibra são a queratina e KAP (proteínas associadas à queratina). As queratinas formam o KIF nos queratinócitos. As KAP estão localizadas na matriz em torno do KIF podendo ser responsável pela rigidez da haste através de ligações cruzada de dissulfureto com o KIF, e, por conseguinte, são também chamadas proteínas de matriz. As KAP's são codificadas por um grande número de famílias multigênicas e são proteínas relativamente pequenas, hidrofóbicas, e têm, frequentemente, estruturas de repetição características [1, 2].

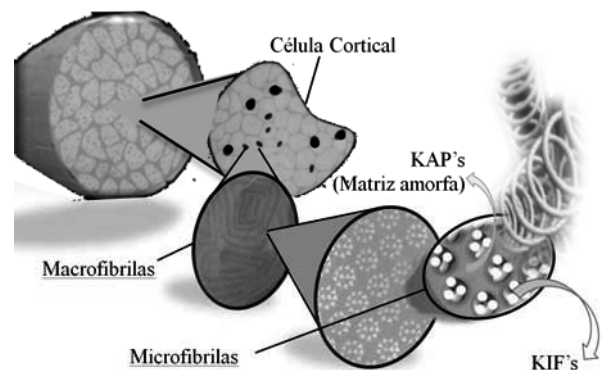


Figura 1: Esquema representativo do cabelo humano e a localização das proteínas.

As Kap's são classificadas basicamente em três grupos de acordo com os aminoácidos característicos envolvidos, proteínas com elevado teor de Enxofre (HS- high-sulfur) com famílias Kap's 1 a 3, 10 a 16, e 23, proteínas com teor de enxofre extremamente elevado (UHS-ultrahigh-sulfur) com famílias Kap's 4, 5, 9 e 17 e também as proteínas com alto teor de glicina e tirosina (HGT-high-glycine/tyrosine) com famílias Kap's 6 a 8 e 18 à 22.

A nomenclatura das Kap's segue como "KAPf-n"; onde "f" refere-se à família e "n" refere-se a um número de identificação do componente [3]. Muitas Kap's foram isoladas a partir de ovelhas, camundongos, coelhos e humanos, classificadas em um total de 23 famílias. Estas proteínas foram modeladas e disponibilizadas em centrais de informações experimentais. O UniProtKB é uma central de informações experimentais e computacional sobre proteínas, incluindo principalmente: sequência de aminoácidos, dados taxonômicos, citações, nome e descrição da proteína. As sequências armazenadas nesse

banco de dados são obtidas da base de dados do EMLBANK/ Gen Bank/ DDBJ [4].

Esta central de informações é dividida em duas seções: UniProtKB/TrEMBL e o UniProtKB/SwissProt. Sendo o primeiro, um banco de dados não revisado que abrange sequências de proteínas unidas à caracterização funcional em larga escala e outras anotações geradas computacionalmente, enquanto que o segundo é revisado e abrange dados de sequências de proteínas não redundantes, experimentos científicos, conclusões científicas e recursos computacionais (UniProtKB Consortium)[4].

Materiais e métodos

No presente estudo, foram obtidas do banco de dados UniprotKB as sequências das proteínas KAP5-5 dos seguintes animais: homem (*Homo sapiens*), camundongo (*Mus musculus*), Chimpanzé (*Pan troglodytes*), da ovelha (*Ovis aries*). Sendo também obtidas as sequências de aminoácidos da KAP19-5 dos seguintes animais: homem (*Homo sapiens*), dois camundongos (*Rattus norvegicus* e *Mus musculus*), chimpanzé (*Pan troglodytes*), Orangotango (*Pongo abelii*) e *Nomascus (Nomascus leucogenys)*.

Em seguida, alinhou-se as sequências utilizando CLUSTAL do UniProtKB (software que alinha as sequências de nucleotídeos e aminoácidos) e calculou-se a distância proporcional, tomou-se como base as informações contidas no site Science in School (2010) [5]. Com isto comparou-se o número de diferenças existentes de um animal para o outro.

Os resultados das Tabelas 2 e 3, foram conseguidos através de um cálculo utilizando as informações do próprio banco de dados UniProtKB ilustrado na Tabela 1. Este raciocínio é descrito na equação 1.

Tabela1: Total de aminoácidos existentes KAP19-5 e KAP5-5 em cada animal

Nº	Espécie	Aminoácidos Total			
		KAP 19-5	Cod. de entrada UniProntKB	KAP 5-5	Cod. de entrada UniProntKB
1	<i>Homo sapiens</i>	72	Q3LI72	237	Q701N2
2	<i>Pan troglodytes</i>	72	H2QKX5	209	H2RBJ4
3	<i>Pongo abelii</i>	72	H2P2X1	-	-
4	<i>Nomascus leucogenys</i>	72	G1SA55	-	-
5	<i>Mus musculus</i>	62	O08632	241	Q2TA51
6	<i>Rattus norvegicus</i>	66	F1LZRO	-	-
7	<i>Ovis aries</i>	-	-	197	Q28584

O número de aminoácidos diferentes (D) é calculado através da equação 1 onde, N_{At} é o número de aminoácidos total e N_{Ax} é o número de aminoácidos idênticos.

$$D = N_{At} - N_{Ax} \quad (1)$$

Nas Tabelas 4 e 5 os resultados foram obtidos efetuando cálculo linha a linha, utilizando as equações 2

e 3.

$$M_{An} = \frac{\sum_i^a N_{Ati}}{a} \quad (2)$$

Onde M_{An} é a média de aminoácidos totais, N_{Ati} número de aminoácidos totais de cada espécie estudada, i é a identificação da espécie e a refere-se à quantidade de animais.

$$P_l = \frac{\sum_i^a (D_{ni} - M_{An})}{a-1} \quad (3)$$

Para a equação 3 temos que P_l é a distância proporcional por linha, D é o número de aminoácidos diferentes (equação 1), M_{An} é a média de aminoácidos totais (equação 2) e a o número de animais envolvidos.

Os dados utilizados foram referentes às Tabelas 2 e 3 levando em consideração os animais que apresentaram menor número de diferenças em direção aos que apresentaram maior número de diferenças, seguiu-se esta regra até que o último animal participasse do cálculo.

Tendo como base dois animais que menos se diferenciavam um do outro, efetuou-se o cálculo da distância proporcional. Considerou-se ainda, um terceiro animal, o qual apresentou menor quantidade de diferenças em relação aos outros dois; com isto, efetuou-se o cálculo da distância proporcional entre o terceiro e os outros dois.

Resultados

Tomando como base a descrição da metodologia e a Tabela 1, foram realizados os cálculos, e seus resultados organizados em tabelas, onde primeiro foi efetuado o cálculo comparativo das diferenças dos aminoácidos, Tabela 2 para a KAP19-5 e Tabela 3 KAP5-5, seguido das tabelas com os dados dos cálculos das médias dos aminoácidos e distância proporcional, Tabela 4 para a KAP19-5 e Tabela 5 KAP5-5.

Com os resultados obtidos nas tabelas foi possível ilustrarmos as árvores filogenéticas das KAP's (Figuras 1 e 2) a qual nos auxiliara na escolha do melhor modelo.

Tabela 2: Cálculos comparativos das diferenças de aminoácidos existentes na KAP19-5 de um animal para o outro.

Grupos	Rattus novergicus	Homo Sapiens	Mus musculus	Pan Troglodytes	Pongo Abelii	Nomascus
<i>Rattus novergicus</i>	0	66-44=22	62-55=7	66-44=22	66-44=22	66-43=23
<i>Homo Sapiens</i>	22	0	62-46=16	0	72-71=1	72-70=2
<i>Mus musculus</i>	7	16	0	16	16	17
<i>Pan troglodytes</i>	22	0	16	0	1	2
<i>Pongo abelii</i>	22	1	62-46=16	1	0	72-71=1
<i>Nomascus</i>	23	2	62-45=17	2	1	0

Tabela 3: Cálculos comparativos das diferenças de aminoácidos existentes na KAP5-5 de um animal para o outro.

Grupos	Homo Sapiens	Pan Troglodytes	Ovis aries	Mus Musculus
<i>Homo Sapiens</i>	0	12	70	83
<i>Pan troglodytes</i>	209-197=12	0	75	57
<i>Ovis aries</i>	197-127=70	197-122=75	0	96
<i>Mus musculus</i>	237-154=83	209-152=57	197-101=96	0

Tabela 4: Cálculos de médias de aminoácidos e distância proporcional da KAP19-5

Grupos	Medias de Aminoácidos (M_{An})	Distância Proporcional (P_i)
<i>Homo sapiens e Pan troglodytes.</i>	72	0,000
<i>Homo sapiens, Pan troglodytes e Pongo abelii.</i>	72	0,014
<i>Homo sapiens, Pan troglodytes, Pongo abelii e Nomascus leucogenys.</i>	72	0,023
<i>Homo sapiens, Pan troglodytes, Pongo abelii, Nomascus leucogenys e Mus musculus.</i>	70	0,232
<i>Homo sapiens, Pan troglodytes, Pongo abelii, Nomascus leucogenys, Mus musculus e Rattus novergicus.</i>	69,33	0,278

Tabela 5: Cálculos de médias de aminoácidos e distância proporcional da KAP5-5

Grupos	Medias de Aminoácidos (M_{An})	Distância Proporcional (P_i)
<i>Homo sapiens e Pan troglodytes.</i>	223	0,054
<i>Homo sapiens, Pan troglodytes e Ovis aries.</i>	214,33	0,337
<i>Homo sapiens, Pan troglodytes, Ovis aries e Mus musculus.</i>	221	0,356

Figura 2: Árvore filogenética da KAP19-5

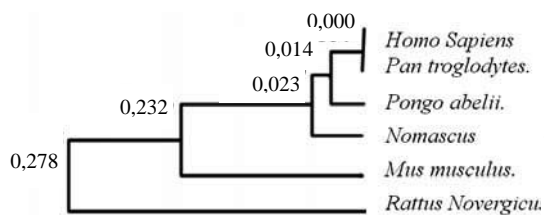
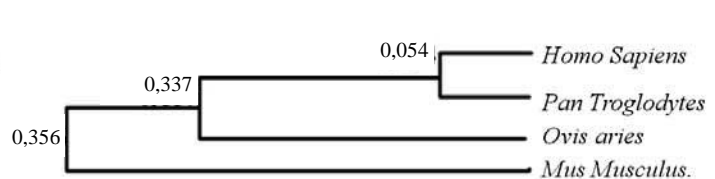


Figura 3: Árvore filogenética da KAP5-5



Discussão

Possuir pelos é uma característica exclusiva dos mamíferos, sendo que os citados neste trabalho são pertencentes à classe dos Eutheria, dos quais, quatro deles são da ordem dos primatas.

O *Homo sapiens* e o *Pan troglodytes* tendem a serem mais semelhantes, tanto para o alinhamento quanto para o distanciamento proporcional que o *Pongo abelii* ou outros macacos em árvores filogenéticas, pois ambos são classificados como homínídeos [6].

Observou-se na Tabela 2 que em relação a KAP19-5, o *Homo sapiens* e o *Pan troglodytes* não se diferenciam nos cálculos (aminoácidos), sendo então, o grupo de maior similaridade, já que para sua proporcionalidade (Tabela 4) a distância é zero; assim os próximos grupos serão o *Pongo abelii* com distância de 0,014, seguido do *Nomascus leucogenys* com 0,023.

Os cálculos demonstraram que o grupo *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*, apresentam distâncias proporcionais de 0,232 e 0,278 respectivamente, ou seja, maior diferença da média dos aminoácidos quando comparado ao grupo *Homo sapiens*.

A Figura 2 ilustra o esquema de uma árvore filogenética da KAP19-5 para os mamíferos relacionados na Tabela 2.

Na Tabela 3, observou-se que, em relação a KAP5-5, o grupo *Homo sapiens* e o *Pan troglodytes* se diferenciam nos cálculos da média dos aminoácidos, porém, mesmo assim, se destacam, sendo então, o grupo de maior similaridade, já que para sua proporcionalidade (Tabela 5) a distância é 0,054.

Os cálculos demonstraram também que os grupos *Ovis aries* e *Mus musculus* apresentam distâncias proporcionais de 0,337 e 0,356 respectivamente, ou seja, maior diferença da média dos aminoácidos quando comparado ao grupo *Homo sapiens*.

A Figura 3 ilustra o esquema de uma árvore filogenética da KAP5-5 para os mamíferos relacionados na Tabela 3.

Observa-se neste estudo, que o uso de camundongos e ovelhas para realização de testes relacionados às proteínas associadas à queratina KAP19-5 e KAP5-5 podem não ser tão eficiente devido à diferença de aminoácidos das proteínas. Conclui-se então que, nestes casos, os melhores modelos a serem utilizados seriam o do próprio *Homo sapiens*, ou ainda primatas homínídeos como é o caso do *Pan troglodytes* cuja similaridade é de 98,6%, já que os demais apresentam cerca de 80 a 85% de similaridade, induzido a um erro de 20 a 15% aproximadamente.

Este relato é de suma importância, pois as KAP's estudadas aparecem no cortex e nas camadas da cutícula da fibra capilar ligadas a outras KAP's de famílias diferentes ou da mesma família [7], podendo também induzir a ideia de que outras KAP's de animais não primatas homínídeos não seriam válidas para desenvolvimento de experimentos e testes, tomando como base a distância proporcional relatada neste trabalho.

Isto pode levar a um acréscimo no que diz respeito à escolha da proteína tanto no estudo de modelamento molecular utilizando cálculos computacionais, quanto na parte de testes laboratoriais. Seguindo esta linha de pensamento podemos julgar que é extremamente desnecessário a retirada de espécie silvestre de seu habitat natural, tal como o *Pan troglodytes*, para se fazer testes cosméticos.

No estado de São Paulo, por exemplo, foi sancionado o projeto de Lei 777/2013, que proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, higiene pessoal, perfumes, e seus componentes [8].

Conclusão

Deste modo, através destas evidências, tanto biologicamente quanto politicamente, torna-se preferível a utilização de amostras (modelos) do próprio *Homo sapiens*, uma vez que está respaldada de forma legal pelo código de ética, e que os estudos são referentes aos pelos e cabelos, ou seja, fibras que provem de células que não tem vida, não causando nenhum tipo de dano à espécie [9].

Agradecimentos

Agradecimentos a Instituição de ensino UNIVAP-FVE, IP&D – Campus Urbanova.

Referências

- [1] Michael A. Rogers, Lutz Langbein, Hermelita. Characterization of a Cluster of Human High/Ultrahigh Sulfur Keratin-associated Protein Genes Embedded in the Type I Keratin Gene Domain on Chromosome 17q12-21. The Journal Of Biological Chemistry 19440–19451, 2001.
- [2] Yutaka Shimomura and Masaaki Ito, Human Hair Keratin-Associated. J Investig Dermatol Symp 230-233, 2005.
- [3] H. Gong, H. Zhou, G. W. McKenzie, Z. Yu, S. Clerens, J. M. Dyer, J. E. Plowman, M. W. Wright, R. Arora, C. S. Bawden, Y. Chen, J. Li, J. G. H. Hickford, An updated nomenclature for keratin-associated proteins (KAPs). International journal of biological sciences; 8(2):258 -264, 2012.
- [4] UNIPROTKB: Documentetion/Help. 2002. Disponível Available from: <http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>.
- [5] Kozłowski, C. Bioinformatics with pen and paper: Building a phylogenetic tree. Science in School [internet] 2010 17:27-33. Available from: <http://www.scienceinschooll.org/2010/issue17/bioinformatics/portuguese#w2>.
- [6] F. Harvey Pough, John B. Heiser, William N. McFarland. A Vida dos Vertebrados. 2 ed. Atheneu: São Paulo, 1999.
- [7] C. R. Robbins. Chemical and Physical Behavior of Human Hair. 5ª ed. St. Springer; 2012.

- [8] BRASIL. Lei 15.316, de 23 de janeiro de 2014. Publicada no Diário Oficial do estado de São Paulo em 24 de janeiro de 2014.
- [9] D. M. Lewis and J. A. Rippon. The Coloration of Wool and other Keratin Fibres. 1^a ed. St John Wiley & Sons in association with the Society of Dyers and Colourists; 2013.