UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ÉRIKA PEREIRA RUBIO

ESTUDO DA FENILTIOCARBAMIDA EM CANAIS K-ATP PARA HIPEREXCITABILIDADE CORTICAL NO AUTISMO POR MEIO DE BIOMODELAGEM COMPUTACIONAL

JEQUIÉ – BA

SETEMBRO/2020

ÉRIKA PEREIRA RUBIO

ESTUDO DA FENILTIOCARBAMIDA EM CANAIS K-ATP PARA HIPEREXCITABILIDADE CORTICAL NO AUTISMO POR MEIO DE BIOMODELAGEM COMPUTACIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Sub-área: Química de Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Gesivaldo Santos

JEQUIÉ – BA

SETEMBRO/2020

R896e Rubio, Érika Pereira.
Estudo da feniltiocarbamida em canais k-atp para hiperexcitabilidade cortical no autismo por meio de biomodelagem computacional / Érika Pereira Rubio.- Jequié, 2020.
56f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação Prof. Dr. Gesivaldo Santos)

1.Autismo 2.Epilepsia 3.Canais K-ATP 4.PTC I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.

CDD – 616.85882

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

ÉRIKA PEREIRA RUBIO

"Estudo da Feniltiocarbamida em Canais K-ATP para Hiperexcitabilidade Cortical no Autismo por meio de Biomodelagem Computacional"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Gesivaldo Santos
(UNICAMP, Campinas – SP, 2009)
(Orientador)

Profa. Dra. Julita Maria Pereira Borges
(UFBA, Salvador – BA, 2018)

Profa. Dra. Jane Lima dos Santos
(UFMG, Belo Horizonte – MG, 2002)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 23 / 09 / 2020

Dedico este trabalho a todos aqueles
que plantaram flores em meu caminho
e fizeram meus dias melhores.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Por várias vezes eu pensei que não fosse conseguir, mas enfim, aqui estou! Obrigada Deus pelo dom da vida, pela minha saúde e por me manter firme no meu propósito em meio a tantas dificuldades! Obrigada por nunca me desamparar!

Agradeço especialmente ao meu orientador! Gesi, obrigada por abrir as portas para essa grande oportunidade em minha vida e num momento tão importante para mim. O mestrado não me trouxe “apenas” crescimento profissional e intelectual, mas abriu meus horizontes para novas perspectivas, desafios e, principalmente, muita superação pessoal. Obrigada por ter sido o elo disso tudo, por ter acreditado em mim, no meu potencial, compreendido os momentos difíceis e pelo choque de realidade quando foi necessário. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado e me desculpe por te decepcionar ao saber que eu ouço Weslley Safadão, o jaleco é um bom disfarce! rs

Agradeço infinitamente aos meus pais, Ester e José Antônio, por incentivarem meus sonhos, por me apoiarem e me ajudarem a vencer essa etapa tão difícil e grandiosa. Mais uma vitória para nossa família! Amo vocês!

A minha mais sincera gratidão ao meu namorado, Mário Junior, não só pelo incentivo, apoio e encorajamento, mas também por entender minha ausência, cansaço e mau humor. Obrigada por ouvir minhas lamentações (“olha Mario Junior...” rs) e pelo abraço que descansa minha alma! Obrigada por fazer parte da realização desse sonho, amorzinho!

Agradeço à minha família pelo cuidado, carinho e orações. Em especial às minhas irmãs de coração Camila e Lai pela “presença mesmo que distante” e pelo suporte técnico que me foi oferecido (sempre me socorrendo com muita agilidade e assertividade, vocês são top! rs). Rafa, meu afilhado, obrigada por participar das minhas “empreitadas”, você é dez!

É muito difícil eleger uma escala de prioridade nos agradecimentos quando se tem tanta gente boa por perto. E, é claro, que eu não poderia deixar de fora um dos maiores apoiadores da minha “causa”, meu gerente e amigo Levi.

“Doctor”, você sabe que sem sua boa vontade nada disso estaria acontecendo. Desde o início se colocou à disposição no que eu precisasse e assim fez. As mudanças de folgas, horários, escala, a compreensão do meu cansaço e de todas as vezes que tive que envolver diretamente meu trabalho, você nunca me negou e sempre fez de coração. Serei eternamente grata! Agradeço especialmente aos meus colegas da filial 825 por sempre colaborarem comigo nos momentos de necessidade, meus companheiros do dia a dia.

Obrigada aos meus amigos e amigas! Hoje a grande maioria está distante, mas a palavra de conforto que diz “vai dar tudo certo”, a demonstração de carinho e preocupação com o “descanse um pouco” e o incentivo com o “você vai arrasar” me enchem de coragem e disposição! É bom contar com vocês!

Agradeço a UESB que é minha casa desde a graduação e mais uma vez abriu portas para o meu crescimento. Tenho um carinho especial por essa Instituição, espero poder contribuir de alguma forma um dia. Agradeço e parabenizo o Programa de Pós-Graduação em Química da UESB por se manter de pé em meio a tantas dificuldades. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento para a realização desta pesquisa.

Aos professores que fizeram parte não só dessa etapa, mas de todo o meu processo de crescimento: minha gratidão. Obrigada pela partilha do conhecimento, por oferecerem subsídios para lutarmos por um futuro melhor, obrigada por serem luz! Agradeço aos meus colegas de turma do mestrado pela ajuda, por me situarem no contexto quando necessário, afinal, a única que não é graduada em química da turma (eu sofri muito bullyng! rs) e pela resenha. Tenho orgulho de fazer parte de uma turma de tão alto nível. Sucesso para todos!

É mais uma etapa que se cumpre! Aqui encerro mais um ciclo transbordando de felicidade. A palavra que me define é gratidão!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar sobre o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todos vêem.”

Arthur Schopenhauer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Receptor Acoplado a Proteína G (GPCR)..... 7

Figura 2. Mecanismo de ação dos GPCR's..... 8

Figura 3. Figura esquemática dos receptores de gosto doce, umami e amargo. 9

Figura 4. Estrutura molecular da PTC. 11

Figura 5. Canal K-ATP 14

Figura 6. Estrutura do canal K-ATP..... 15

Figura 7. Estrutura de SUR1 16

Figura 8. Rede de coexpressão gênica. 30

Figura 9. Sobreposição da expressão gênica de TAS2R, GABARB1 E GABRA1 no tronco encefálico 36

Figura 10. Mapa 2D e de potencial interação da GBC (A) e PTC (B) no sítio ativo do complexo SUR1 - ABC. 37

Figura 11. Mapa 2D e de potencial interação da RPG no sítio ativo do complexo Kir6.2/SUR1. 39

Figura 12. Mapa 2D e de potencial interação da GBC no sítio ativo da RPG no complexo Kir6.2/SUR1. 40

Figura 13. Mapa 2D e de potencial interação da PTC no sítio ativo da RPG no complexo Kir6.2/SUR1. 41

Figura 14. Mapa 2D e de potencial interação da CBZ no sítio ativo da RPG no complexo Kir6.2/SUR1. 42

Figura 15. Representação do docking concomitante dos ligantes RPG, GBC, PTC e CBZ (verde) no sítio ativo da RPG (complexo Kir6.2/SUR1). 43

Figura 16. Docking molecular no sítio ativo da RPG no canal K-ATP 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Receptores de gosto e sua importância para o organismo. 7
Tabela 2. Mecanismo de ação de fármacos antiepilépticos. 20
Tabela 3. Critérios farmacodinâmicos de estabilidade ligante-receptor. 28
Tabela 4. Relação funcional entre os genes e seus respectivos scores 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina Difosfato
Ala	Alanina
Arg	Arginina
ASD	Transtorno do Espectro Autista (Autism Spectrum Disorder)
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
ATP	Adenosina Trifosfato
CBZ	Carbamazepina
CRD	Domínio Rico em Cisteína
Cys	Cisteína
DAG	Diacilglicerol
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GBC	Glibenclamida
GDP	Guanosina Difosfato
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
Gly	Glicina
GPCR	Receptor Acoplado à Proteína G
GSEA	Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (Gene Set Enrichment Analysis)
GTP	Guanosina Trifosfato
GTPase	Guanosina Trifosfatase
His	Histidina
Ile	Isoleucina

IP3	Inositoltrifosfato
K-ATP	Canais de K^+ dependentes de ATP
Kcal/Mol	Quilocalorias por mol
L0	Laço Intracelular
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
NBD	Domínio de ligação a Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDB	Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank)
Phe	Fenilalanina
PIP2	Fosfatidilinositol Difosfato
PLC	Fosfolipase C
Pro	Prolina
PTC	Feniltiocarbamida
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPG	Repaglinida
Ser	Serina
SFARI	Iniciativa de Pesquisa em Autismo da Fundação Simons (Simons Foundation Autism Research Initiative)
TAS1R	Receptor de Gosto Tipo 1 (Taste Receptor type 1)
TAS2R	Receptor de Gosto Tipo 2 (Taste Receptor type 2)
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro Autista
Thr	Treonina
TM	Transmembranar

TMD	Domínio Transmembranar
Trp	Triptofano
TRPM5	Potencial do Receptor Transitório M5
Tyr	Tirosina
Val	Valina
VFT	Armadilha de Vênus
VGNC	Canais de Na^+ Dependentes de Voltagem

LISTA DE SÍMBOLOS

[ ]	Concentração
Å	Angstrom
Ca^{2+}	Cálcio
Cl^{-}	Cloro
K^{+}	Potássio
Mg	Magnésio
Na^{+}	Sódio
ΔG	Energia Livre
π	Pi
σ	Sigma

Estudo da Feniltiocarbamida em Canais K-ATP para Hiperexcitabilidade Cortical no Autismo por meio de Biomodelagem Computacional

Autor: Érika Pereira Rubio

Orientador: Dr. Gesivaldo Santos

O Transtorno do Espectro Autista é uma condição do neurodesenvolvimento na qual é muito frequente a presença de comorbidades como a epilepsia e alterações no processamento sensorial, com fortes evidências de fatores genéticos associados. A epilepsia se manifesta por meio de convulsões, sendo resultado de um desequilíbrio na atividade dos sistemas neuronais excitatórios e inibitórios que são controlados pelo Ácido Gama-Aminobutírico (GABA). A liberação de GABA nos neurônios é feita por meio dos canais K-ATP regulados pela relação ATP/ADP. Quando essa relação é maior, esses canais se fecham, despolarizando a membrana celular e provocando o influxo de Ca^{2+} que, por sua vez, atuam na liberação de GABA. De forma semelhante acontece com os receptores de gosto amargo que são receptores acoplados à proteína G e quando ativados pela feniltiocarbamida (PTC) desencadeiam uma cascata de reações culminando no aumento de cálcio citossólico. Diante dessas evidências, decidimos avaliar o uso da PTC como um possível tratamento para a epilepsia no autismo por meio da ligação aos canais K-ATP. Essa avaliação foi feita por meio de estudos neurogenômico e de docking molecular. Os resultados obtidos demonstraram a relação funcional dos genes que expressam as proteínas formadoras dos canais K-ATP, os receptores de gosto amargo e os receptores GABAérgicos, sendo, provavelmente, mais exacerbados em indivíduos com autismo. Além disso, observamos que a expressão gênica destes receptores de gosto amargo, se sobrepõe à dos receptores K-ATP em neurônios GABAérgicos. Os estudos de acoplamento

molecular demonstraram a afinidade da PTC pelo sítio ativo da repaglinida no canal K-ATP, com uma energia de afinidade de -6,0 Kcal/Mol e a comparação realizada com o padrão anticonvulsivante carbamazepina (CBZ) no mesmo sítio ativo demonstrou excelente afinidade, com energia de -7,4 Kcal/Mol. Essas descobertas demonstram uma atividade *off label* para a CBZ, assim como reforça a proposta da PTC apresentar uma atividade anticonvulsivante.

Palavras-chave: Autismo, Epilepsia, Canais K-ATP, PTC.

Phenylthiocarbamide Study in K-ATP Channels for Cortical Hyperexcitability in Autism by Computational Biomodeling

Author: Érika Pereira Rubio

Advisor: Dr. Gesivaldo Santos

Autism Spectrum Disorder is a neurodevelopmental condition which often exhibits comorbidities. Epilepsy and changes in sensory processing with strong evidence of genetic factors associated. Epileptic seizures are manifestations as a result from an imbalance between excitatory and inhibitory neuronal systems controlled by Gamma-aminobutyric acid (GABA). Release of GABA in neurons is done through the K-ATP channels regulated by the ATP / ADP´s relationship. When this relationship increases these channels close themselves. It causes depolarization of the cell membrane and influx of Ca^{2+}, in its turn, they act on the release of GABA. It happens similar with the receptors of bitter taste that are G protein-coupled receptor which, when activated by phenylthiocarbamide (PTC) trigger many reactions culminating in the increase of cytosolic calcium. Thus, we have decided to check the use of PTC as a possible epilepsy treatment in autism through the K-ATP channels connection. This assessment was been made using neurogenomic studies and molecular docking. The results obtained had demonstrated the functional relationship of the genes that express: the proteins who form the K-ATP channels, the bitter taste receptors and the GABAergic receptors. It has been more exacerbated in individuals with autism. Besides, we observed the gene expression of these bitter-tasting receptors overlaps that of K-ATP receptors in GABAergic neurons. Molecular coupling studies showed the affinity of PTC for the active site of repaglinide in the K-ATP channel, with an affinity energy of -6.0 Kcal/Mol. The approach made with the anticonvulsant carbamazepine in the same active site showed an excellent affinity, with energy

of -7.4 Kcal/Mol. These findings present an off-label use for carbamazepine as well as reinforcing proposal of PTC to exhibit an anticonvulsant activity.

Keywords: Autism, Epilepsy, Channels K-ATP, PTC.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

2.1 Transtorno do Espectro Autista 4

2.2 Receptores de Gosto 6

2.3 Feniltiocarbamida e Receptores de Amargo 10

2.4 Hiperexcitabilidade Cortical e Neuroproteção 12

2.4.1 Canais K-ATP 13

2.4.2 Tratamento da Hiperexcitabilidade Cortical 18

3 OBJETIVOS 21

3.1 Objetivo Geral 21

3.2 Objetivos Específicos 21

4 MATERIAIS E MÉTODOS 22

4.1 Interação Gênica 23

4.2 Enriquecimento Gênico 23

4.3 Ontologia Gênica 24

4.4 Análise do Perfil de Expressão Neuroanatômico 25

4.5 Escolha do Alvo Molecular 25

4.6 Docking Molecular 26

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

5.1 Triagem de novos genes expressos no TEA 29

5.2 Ontologia Gênica 30

5.3 Perfil de Expressão Gênica 35

5.4 Escolha do Alvo Molecular 36

5.5 Docking Molecular 37

5.5.1 Docking envolvendo o sítio ativo da GBC no complexo Kir6.2/SUR1 37

5.5.2 Docking envolvendo o sítio ativo da RPG no complexo Kir6.2/SUR1 38

5.5.2.1 Docking da GBC no complexo Kir6.2/SUR1 39

5.5.2.2 Docking da PTC no complexo Kir6.2/SUR1 41

5.5.2.3 Docking da CBZ no complexo Kir6.2/SUR1 42

5.5.3 Análise do docking molecular envolvendo o canal K-ATP 44

6 CONCLUSÃO 47

7 PERSPECTIVAS ..... **Erro! Indicador não definido.**

REFERÊNCIAS 48

1 INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma condição do neurodesenvolvimento que apresenta heterogenia comportamental, caracterizando-se, principalmente, por embotamento afetivo e comportamentos estereotipados (BOURGERON, 2015; UNDURTI *et al,* 2013). Embora de etiologia desconhecida, há evidências de uma correlação multifatorial associada ao TEA, tais como: fatores genéticos, hereditários, poligênicos, mutacionais e epigenéticos (LORD *et al*, 2018). A prevalência mundial está estimada em 1 para cada 160 crianças (OMS, 2019). Além dos sintomas característicos, é comum a existência de comorbidades associadas como: transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), epilepsia, deficiência intelectual, distúrbios gastrointestinais, imunitários, alteração no processamento sensorial, dentre outras (BÖLTE *et al*, 2019; BOURGERON, 2015; OMS, 2019).

A epilepsia é uma comorbidade fortemente associada ao TEA, com uma prevalência que pode chegar a 46% (BUCKLEY & HOLMES, 2016; JUNEJA *et al*, 2018; SPENCE & SCHNEIDER, 2009; TUCHMAN *et al*, 2010). Trata-se de uma afecção caracterizada por hiperexcitabilidade cortical, resultado de um desequilíbrio entre os sistemas neuronais excitatórios e inibitórios que pode ocorrer em condições de estresse como na hipóxia ou hipoglicemia (BADAWY *et al*, 2009; SANTOS *et al*, 2019; VETROVOY *et al*, 2017). O controle dessa hiperexcitabilidade é realizado pelo principal neurotransmissor inibitório cortical, o ácido gama-aminobutírico (GABA) que, além de atuar no controle da crise convulsiva, desempenha papel crucial nos processos de neuroproteção (BADAWY *et al*, 2009).

Os neurônios GABAérgicos encontram-se largamente distribuídos no cérebro, porém, concentram-se sobretudo, no tronco e núcleos da base (SANTOS *et al*, 2019). O processo de liberação do GABA está associado ao aumento da concentração de Ca^{2+} citossólico por meio dos canais de K^{+} dependentes de ATP (canais K-ATP), que, por sua vez, vinculam o estado metabólico da célula ao potencial de ação e liberação de neurotransmissores (AMOROSO *et al*, 1990). A atividade dos canais K-ATP é regulada pela relação ATP/ADP (SANTOS *et al*, 2019). Em situações nas quais a razão ATP/ADP é maior, o canal K-ATP se fecha, despolarizando a membrana e

abrindo canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, com a consequente liberação de GABA (YAMADA & INAGAKI, 2002). Esse mecanismo atribui a esses canais importante atividade neuroprotetora (SANTOS *et al*, 2019).

Semelhante ao que ocorre nos canais K-ATP, os receptores de gosto amargo, quando ativados por um agonista como a PTC, desencadeiam uma série de reações através da proteína Gq, especificamente α-gustaducina, que culminam no aumento de cálcio citossólico (KINNAMON, 2016). Esses receptores apresentam uma família composta por, pelo menos, 25 subtipos em humanos (BEHRENS & MEYERHOF, 2019), podendo ser ativados por inúmeras moléculas (TOLE *et al*, 2019). A PTC é uma molécula amplamente descrita na literatura para avaliar a atividade de receptores de gosto amargo (receptores de gosto tipo 2 - TAS2R) (BIARNÉS *et al*, 2010; IGBENEGHU *et al*, 20019; PALMER, 2018; TAN *et al*, 2012), sendo conhecida pelo gosto amargo que atribui a diversos alimentos e bebidas como café, chás, cerveja e, principalmente, vegetais crucíferos, como brócolis, repolho, couve, dentre outros (DREWNOWSKI *et al*, 2001; WARWICK, 2010) que estão presentes no nosso cotidiano.

A percepção do gosto, particularmente o doce e o amargo, exerce importante papel na escolha e determinação das preferências alimentares, além de contribuir na distinção de alimentos deteriorados e substâncias tóxicas para o organismo (EKSTRAND *et al*, 2017). Recentemente, verificou-se que, além de desempenhar funções na percepção do gosto, os receptores de gosto doce e amargo também agiriam como sentinelas do sistema imunitário (JI *et al*, 2014). Espalhados pelos mais variados órgãos, inclusive cérebro, intestinos e pulmões, atuariam como guardiões numa primeira linha de defesa do sistema imune inato (JI *et al*, 2014). Além da variabilidade genética, alterações na percepção do gosto amargo também estão relacionadas com doenças como Parkinson (MOBERG *et al*, 2007) e Autismo (BENNETTO *et al,* 2007).

A hiperseletividade e hiposensibilidade a determinado alimento e percepção alterada ao gosto doce e amargo em indivíduos com TEA podem estar relacionadas a desordens nesses receptores de gosto específicos (BENNETTO *et al*, 2007;

UNDURTI *et al*, 2013). Dados da literatura dão conta de que indivíduos com autismo exibem comprometimento na percepção do gosto doce e amargo, quando comparados a um grupo controle (BENNETTO *et al*, 2007). Em condições fisiológicas, a ativação dos receptores TAS2 aumentam a concentração de Ca^{2+} no interior da célula (KINNAMON, 2016). A expressão de receptores TAS2 em neurônios GABAérgicos nas regiões do tronco e núcleos da base poderia implicar na liberação de GABA (dependente do aumento de Ca^{2+}) e, consequentemente, na atividade neuroprotetora que o mesmo exerce.

Com base nesses fatos, procura-se saber se essa redução da sensibilidade, normalmente associada a polimorfismos genéticos nos receptores TAS1 e TAS2, poderia implicar em consequências mais profundas como doenças metabólicas ou transtornos comportamentais em indivíduos com TEA (BOGUSKI *et al*, 2004). E, com isso, avaliar a possibilidade de um agonista de TAS2R ser capaz de atuar como coadjuvante no mecanismo de liberação GABAérgico, controle da hiperexcitabilidade cortical e, consequentemente, neuroproteção. Nosso estudo teve uma abordagem teórica, na qual fizemos avaliações por meio de técnicas de biologia de sistemas como neurogenômica e química computacional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Transtorno do Espectro Autista

O autismo ou transtorno do espectro autista (TEA) é como uma condição de neurodesenvolvimento que possui como principais características aspectos relacionados à comunicação e relacionamento interpessoal. Comportamentos estereotipados, repetitivos, dificuldade de socialização e comunicação, desinteresse e respostas incomuns aos estímulos sensoriais são características bem definidas de indivíduos com TEA (BOURGERON, 2015; UNDURTI *et al*, 2013).

Essa síndrome manifesta-se nos primeiros anos de vida, geralmente antes dos cinco anos de idade, persistindo pela fase adulta (OMS, 2019, UNDURTI *et al*, 2013). Acomete mais homens, sendo 4 vezes mais comum no gênero masculino do que no feminino (BAIO *et al*, 2018). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a prevalência mundial de indivíduos com TEA seja de 1 para cada 160 crianças (OMS, 2019). Nos Estados Unidos, entre os anos de 2000 e 2014 as estimativas chegaram a crescer 150% em crianças de 8 anos de idade. De 2000 a 2002 a prevalência era de 1 em 150 crianças, de 2010 a 2012 esse número foi para 1 em 68 crianças, chegando em 2014 de 1 para cada 59 crianças. A prevalência em crianças brancas é 20% maior do que em crianças negras e 50% maior do que em crianças hispânicas (BAIO *et al*, 2018). 1% da população inglesa é acometida com TEA (LORD *et al*, 2018). Os números referentes à epidemiologia dessa condição aumentaram muito nos últimos anos com o desenvolvimento de pesquisas na área, no entanto, são ainda bastante escassos nos países em desenvolvimento (BAXTER *et al*, 2015; OMS, 2019).

Processamento de informação afetado, crescimento anormal do cérebro e conectividade neuronal alterada são algumas suposições propostas que caracterizam os sintomas do autismo, estando envolvidos com plasticidade sináptica (BOURGERON, 2015; GILBERT & MAN, 2017; UNDURTI *et al*, 2013).

A etiologia do autismo é desconhecida, podendo estar associada a fatores genéticos, hereditários, mutacionais, ambientais, dentre outros e as manifestações podem apresentar diferentes graus de um indivíduo para o outro, como, também, se alterarem com o passar do tempo (LORD *et al,* 2018). Sabe-se que as alterações genéticas têm importância fundamental no TEA, assim como a herdabilidade dessas alterações (GABIS, 2019; PAIN *et al*, 2019) e que diversos genes podem contribuir com o fenótipo (FISCHBACH & LORD, 2010). No que diz respeito às causas ambientais, diversos fatores são considerados: problemas de saúde da mãe no período de desenvolvimento do feto como obesidade, diabetes e hipertensão; exposição durante a gestação a hormônios, medicamentos (BÖLTE *et al*, 2019), infecções ou qualquer tipo de acometimento no sistema nervoso central no período de desenvolvimento (GABIS, 2019).

O diagnóstico de indivíduos com autismo nem sempre acontece em idade precoce devido à heterogeneidade dos sintomas. De forma geral, a idade média de diagnóstico é de 4,5 anos (BAIO *et al*, 2018). A inexistência de marcadores biológicos e as mudanças nos critérios diagnósticos muitas vezes impossibilitam uma intervenção precoce nesses indivíduos. O diagnóstico é clínico e envolve, principalmente, aspectos relacionados a duas áreas: comunicação (dificuldades de interação e comunicação social) e comportamento (atividades e interesses com padrões restritos e repetitivos) (BAIO *et al*, 2018).

Além disso, avalia-se os níveis de gravidade dos sintomas e a necessidade de suporte específico para cada caso, comorbidades associadas, déficits motores, comprometimento intelectual e de linguagem e exames neurológicos (APA, 2013; GABIS, 2019; LORD *et al*, 2018).

Além dos sintomas característicos, é comum a existência de comorbidades associadas como epilepsia, deficiência intelectual, dificuldades de controle motor, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), ansiedade, depressão, distúrbios de sono, problemas gastrointestinais, imunológicos, endócrinos e alterações no processamento sensorial (BÖLTE *et al*, 2019; BOURGERON, 2015; OMS, 2019).

A epilepsia é uma comorbidade fortemente presente no TEA, estando associados desde o início dos estudos que envolveram o autismo na década de 1960 (TUCHMAN *et al*, 2010). A prevalência média é de 30% (TUCHMAN *et al*, 2010), variando de 5% a 46% de acordo com critérios de estudos, população e diagnóstico (BUCKLEY & HOLMES, 2016; JUNEJA *et al*, 2018; SPENCE & SCHNEIDER, 2009). Tanto o diagnóstico do autismo quanto os aspectos fisiopatológicos e etiológicos que envolvem a epilepsia são complexos e heterogêneos (TUCHMAN *et al*, 2010; WEI *et al*, 2017). Plasticidade sináptica e excitabilidade anormal no cérebro estão envolvidas no desenvolvimento de ambas as situações, indicando uma alta correlação entre elas (BUCKLEY & HOLMES, 2016; JUNEJA *et al*, 2018).

Com relação às alterações no processamento sensorial, indivíduos com TEA apresentam uma alta seletividade na alimentação, com resposta sensorial anormal e comprometimento na percepção dos gostos doce e amargo. Estudos revelam que essas características podem estar diretamente associadas a desordens nos receptores de gosto doce e amargo, implicando não somente em fatores nutricionais, mas numa ineficiência de sinalização destes receptores (BENNETTO *et al,*2007; UNDURTI *et al*, 2013).

2.2 Receptores de Gosto

O sentido do paladar está associado a questões nutricionais e informações relacionadas à qualidade dos alimentos como estado de conservação e à segurança deles, podendo evitar até mesmo toxicidade por meio da alimentação. Cada característica do paladar pode ser identificada por receptores específicos que estão presentes na língua e são agrupados em papilas gustativas. Atualmente, cinco qualidades de gosto são descritas na literatura: gosto doce, amargo, azedo, salgado e umami, estando cada um associado a uma característica peculiar (Tabela 1) (BEHRENS & MEYERHOF, 2016; EKSTRAND *et al*, 2017).

Tabela 1. Receptores de gosto e sua importância para o organismo.

Receptor	Tipo	Importância
Doce	Acoplado a proteína G	Suprimento de energia necessária ao organismo
Umami	Acoplado a proteína G	Percepção de ingestão de proteínas
Amargo	Acoplado a proteína G	Identificação de substâncias potencialmente tóxicas
Salgado	Canal iônico	Homeostase do equilíbrio hidroeletrolítico
Azedo	Canal iônico	Equilíbrio do metabolismo ácido-base e proteção à corrosão causadas por substâncias ácidas

Fonte: Elaborada pelo autor com base em BEHRENS & MEYERHOF, 2019 e MUNGER, 2016.

Os receptores de gosto doce, umami e amargo pertencem a família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR's) (BEHRENS & MEYERHOF, 2016). De forma geral, os GPCR's são proteínas de membrana que intermedeiam respostas intracelulares provenientes de estímulos extracelulares. Participam de inúmeros processos fisiológicos, sendo amplamente estudados e alvo de pesquisas no desenvolvimento de novos fármacos no mundo inteiro (DI PIZIO *et al,* 2016). A estrutura básica dos GPCR's é formada por sete α-hélices transmembranares (7TM) interligadas por três alças que estão presentes no meio extracelular (ECL1 - 3) com um domínio N terminal e três alças no meio intracelular (ICL1 – 3) ligadas a um domínio C terminal (Figura 1) (KINNAMON, 2016; WEIS & KOBILKA, 2018).

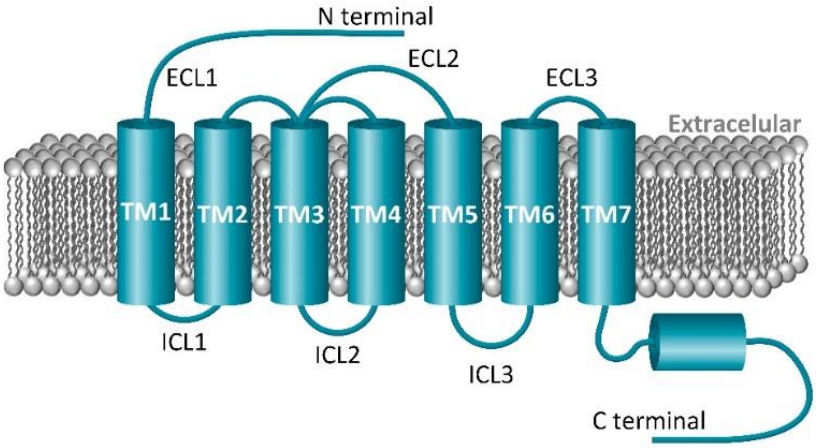

Figura 1. Estrutura do Receptor Acoplado a Proteína G (GPCR). Alça extracelular (ECL) e alça intracelular (ICL). Fonte: adaptado de WEIS & KOBILKA, 2018.

A proteína G associada a esses receptores é a gustaducina. Ela apresenta estrutura heterotrimérica e é formada pelas subunidades Gα, Gβ3 e Gγ13, formando o complexo Gαβγ e o mecanismo de ação desses receptores se dá através da ativação da subunidade α-gustaducina. A proteína G inativa encontra-se com a subunidade α ligada a uma molécula de difosfato de guanosina (GDP), com a alteração conformacional do receptor promovida pela interação com o ligante, a molécula de GDP se desloca da subunidade α e uma molécula de guanosina trifosfato (GTP) se liga a ela, caracterizando a forma ativa da proteína. Estando no estado ativo, o complexo Gαβγ se dissocia do receptor ao mesmo tempo que as subunidades α-GTP se dissocia do complexo βγ (EKSTRAND *et al*, 2017; SPAGGIARI *et al*, 2020). O complexo βγ ativa segundos mensageiros dentro da célula (principal característica do mecanismo de ação da proteína G), amplificando o sinal desencadeado pelo ligante (Figura 2). O processo de sinalização é finalizado pela ação da enzima guanosina trifosfatase (GTPase) que se encontra ligada a subunidade α (KINNAMON, 2016).

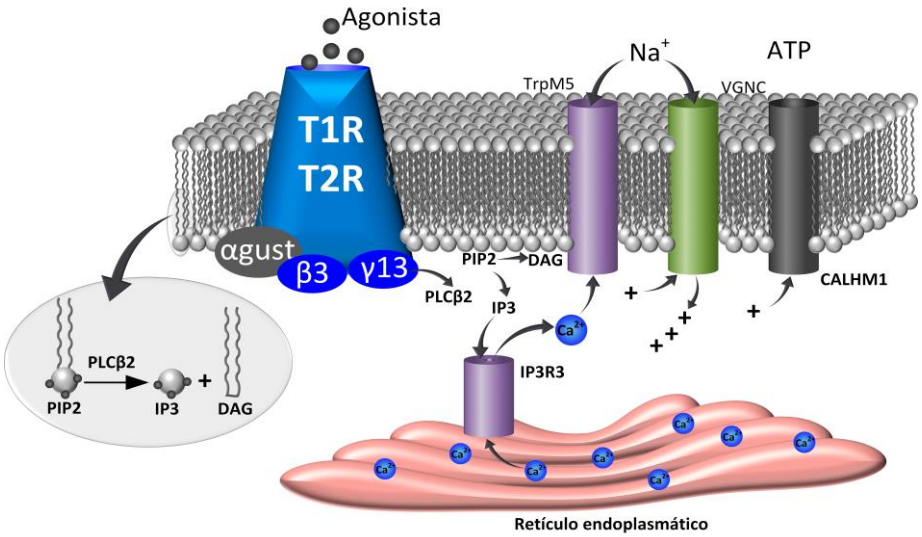

Figura 2. Mecanismo de ação dos GPCR's. A ligação de um agonista ao receptor resulta na dissociação da proteína G heterotrimérica (α-gustaducina, Gβ3 e Gγ13) levando a um aumento da atividade da fosfolipase C-β2 (PLC-β2) que, por sua vez, cliva fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). IP3 ativa o receptor IP3 tipo III (IP3-R3) presente na membrana do retículo endoplasmático, estimulando a liberação de Ca^{2+}. O aumento da [Ca^{2+}] intracelular leva à ativação do canal potencial do receptor transitório M5 (TRPM5), desencadeando o influxo de Na^{+} na célula e consequente despolarização da membrana. Os canais de Na^{+} dependentes de voltagem (VGNC) são ativados gerando um potencial de ação e a liberação de adenosina trifosfato (ATP) através de um canal ATP dependente de voltagem (CALHM1) que, por sua vez, estimula as fibras nervosas eferentes. **Fonte:** adaptado de KINNAMON, 2016.

A percepção do gosto doce e umami é dada pelo receptor de gosto tipo 1 (TAS1R) que apresenta três subunidades: TAS1R1, TAS1R2 e TAS1R3 (Figura 3). As subunidades TAS1R1 e TAS1R3 formam o heterodímero que caracteriza o receptor de gosto umami, enquanto o receptor de doce é formado pelas subunidades TAS1R2 e TAS1R3 (BEHRENS & MEYERHOF, 2016; SPAGGIARI *et al*, 2020). Os receptores TAS1R apresentam diversos locais de ativação, essa característica lhes permite interagir com inúmeras moléculas de gosto doce (BEHRENS & MEYERHOF, 2016).

Os receptores de gosto amargo são codificados pelos genes TAS2R (receptor de gosto tipo 2) (Figura 3) e já foram subdivididos numa faixa de, aproximadamente, 25 subtipos na espécie humana e 35 em camundongos (Tas2r) (BEHRENS & MEYERHOF, 2019). Esses receptores podem ser ativados por inúmeras moléculas amargas, no qual uma mesma molécula se liga de forma diferente em vários receptores, podendo ser reconhecida por diversos deles; além disso, sabe-se que algumas moléculas ativam determinados receptores e outros não, levando a crer que esse processo se desenvolveu ao longo do tempo como um mecanismo de defesa das espécies, evitando um bloqueio total dos receptores TAS2, já que o gosto amargo está fortemente associado à ingestão de substâncias tóxicas (TOLE *et al*, 2019).

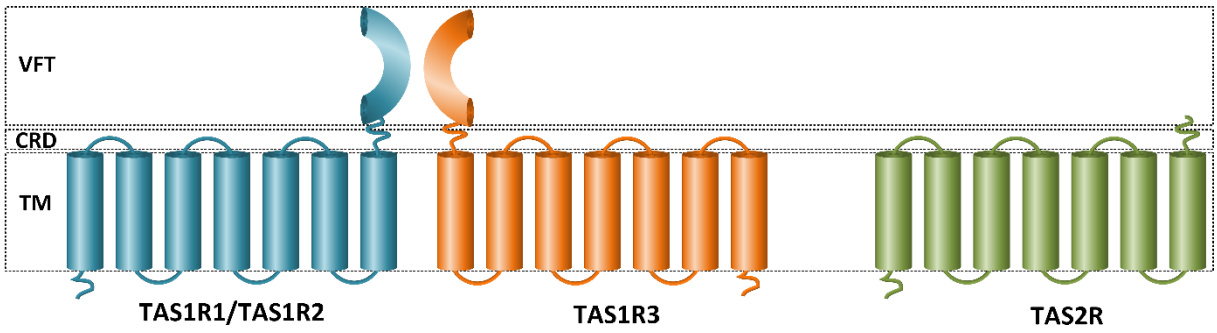

Figura 3. Figura esquemática dos receptores de gosto doce, umami e amargo. Do lado esquerdo (azul e laranja) temos representado o receptor de doce (subunidades TAS1R2 e TAS1R3) e umami (subunidades TAS1R1 e TAS1R3) que são heterodímeros obrigatórios com a subunidade TAS1R3 em comum. Esses receptores apresentam uma estrutura básica comum que compreende: domínio amino terminal extracelular, também conhecido como domínio de armadilha de vênus (VFT), responsável pela ligação do receptor ao ligante; domínio rico em cisteína (CRD), que liga o domínio amino terminal extracelular ao transmembranar; e, domínio transmembranar (TM), que compreende sete regiões localizadas dentro da membrana conectadas por três alças extracelulares e 3 alças intracelulares, que transmitem as alterações às regiões intracelulares. Do lado direito (verde) está representado o receptor de amargo (TAS2R) com 7 domínios TM conectados por 3 alças intracelulares e 3 extracelulares e uma região C terminal intracelular. **Fonte:** adaptado de SPAGGIARI *et al*, 2020.

Durante muito tempo considerou-se que os receptores de gosto estivessem presentes somente na língua e que algumas regiões determinadas abrigariam botões gustativos específicos para cada gosto, no entanto, a relação do mecanismo de ação dos receptores de gosto doce e amargo com a proteína G levaram os cientistas a correlacionarem a possível presença desses receptores em tecidos extra-orais (BEHRENS & MEYERHOF, 2011). Atualmente, sabe-se que estão presentes em diversos tecidos como: cérebro, coração, sangue, trato respiratório, pâncreas, trato urogenital, testículos, glândula tireóide, timo e trato gastrointestinal (BEHRENS & MEYERHOF, 2019). A presença dos receptores gustativos no trato gastrointestinal está relacionada com a regulação da utilização de nutrientes e controle do apetite (SPAGGIARIA, 2020), acredita-se que os receptores de sabor doce estejam envolvidos diretamente na secreção do hormônio da fome (LAFFITTE *et al*, 2014). Receptores de amargo estão envolvidos com atividade anti-inflamatória na asma (DI PIZIO *et al*, 2019). Esses receptores estão presentes também no sistema imunológico, sendo ativados nessas diferentes regiões pelos mesmos agonistas (BEHRENS & MEYERHOF, 2011; JI *et al*, 2014), podendo haver uma interação entre as vias de sinalização dos mesmos (LEE *et al,* 2014). Diante dessa vasta presença no organismo humano, os receptores TAS1 e TAS2 estão se tornando alvos para diferentes áreas de estudo, dentre elas a síndrome do espectro do autismo (BENNETTO *et al,*2007).

2.3 Feniltiocarbamida e Receptores de Amargo

A ativação dos receptores de gosto amargo pode ser realizada por uma variedade de compostos, estima-se que existam mais de 700 agonistas com diferentes estruturas capazes de ativar TAS2R (JAGGUPILLI *et al*, 2016). Um composto considerado padrão para a avaliação do efeito da ativação desses receptores e amplamente citado na literatura é a feniltioureia, também conhecida como feniltiocarbamida ou PTC (BIARNÉS *et* al, 2010; IGBENEGHU *et al*, 20019; PALMER, 2018; TAN *et al*, 2012).

A PTC (Figura 4) pertence à classe das tioureias e apresenta fórmula molecular $C_7H_8N_2S$, sendo uma tioureia com um hidrogênio substituído por um grupo fenil

(PUBCHEM, 2020). As tiouréias formam uma importante classe de agonistas de receptores TAS2, podendo ser encontradas em diversos alimentos e bebidas, como café, chás, cerveja e, principalmente, em vegetais crucíferos, sendo amplamente conhecidas pelo gosto amargo que atribui a esses alimentos (DREWNOWSKI *et al*, 2001).

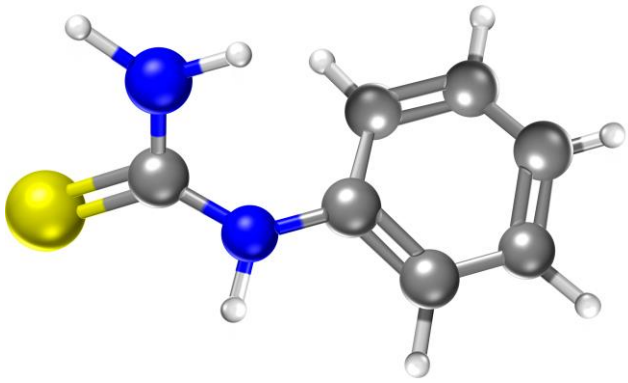

Figura 4. Estrutura molecular da PTC. Estrutura formada por uma tioureia (CH4N2S) com um hidrogênio substituído por um grupo fenil. Cinza escuro: Carbono; cinza claro: Hidrogênio; azul: Nitrogênio; amarelo: Enxofre. **Fonte:** adaptado de PUBCHEM, 2020.

Os vegetais crucíferos pertencem à família Brassicaceae, também conhecida como Cruciferae. Diversas espécies vegetais, oleaginosas e condimentares pertencem a essa família e estão amplamente presente no nosso dia-a-dia. Vegetais como couve, couve-de-bruxelas, couve-flor, repolho, brócolis, nabo, mostarda, rabanete, canola, dentre outras variedades, compõem a grande família das crucíferas (WARWICK, 2010). O sabor amargo presente nesses alimentos, atribuído a compostos como a PTC, é uma das principais características responsáveis pelas preferências alimentares dos seres humanos (PALMER, 2018), além de ter sido usada ao longo da evolução como uma defesa para evitar a ingestão de vegetais contendo substâncias potencialmente tóxicas (TOLE *et al*, 2019).

Os indivíduos podem ser classificados entre provadores e não provadores de acordo a variabilidade genética dos receptores TAS2 e, consequentemente, sua capacidade de sentir ou não o gosto amargo (PALMER, 2018). No entanto, além da variabilidade genética, alterações na percepção do gosto amargo também estão

relacionadas com doenças como Parkinson (MOBERG *et al*, 2007) e Autismo (BENNETTO *et al,*2007).

Em meio a enorme variedade de ativadores de TAS2R, escolhemos a PTC para ser usada em nosso estudo com base em dois critérios importantes: o fato de ser um padrão amplamente utilizado em pesquisas relacionadas (BIARNÉS *et* al, 2010; IGBENEGHU *et al*, 20019; PALMER, 2018; TAN *et al*, 2012) e, principalmente, por ser um produto natural presente numa grande variedade de espécies vegetais (WARWICK, 2010) que fazem parte da nossa alimentação cotidiana e podem ser facilmente encontrados.

2.4 Hiperexcitabilidade Cortical e Neuroproteção

A hiperexcitabilidade cortical é caracterizada como um desequilíbrio na atividade dos sistemas neuronais excitatórios e inibitórios, tornando a rede neuronal hiperexcitada por uma constante atividade elétrica que se manifesta clinicamente como convulsões epilépticas (BADAWY *et al*, 2009; STALEY, 2015; WEI *et al*, 2017).

As causas desse desequilíbrio podem ser inúmeras, dentre elas estão a desregulação na atividade dos canais iônicos e do sistema GABAérgico (BADAWY *et al*, 2009). A primeira é finamente regulada para manter o equilíbrio iônico dentro e fora da célula e controle da excitabilidade neuronal. O fluxo de íons através dos canais pode ser regulado pela diferença de potencial da membrana ou por ligantes intra ou extracelulares. Quando esses canais apresentam qualquer tipo de desequilíbrio, eles comprometem a regulação do potencial de ação, de modo que a célula fica hiperexcitada (BADAWY *et al*, 2009; WEI *et al*, 2017). A ineficiência da atividade GABAérgica, por sua vez, resulta em epilepsia e pode ser provocada pela redução na liberação de GABA, aumento do metabolismo ou dessensibilização dos receptores (BADAWY *et al*, 2009). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório nas estruturas corticais, sua ação garante o equilíbrio entre as atividades neuronais excitatórias e inibitórias, além do controle da plasticidade sináptica (BADAWY *et al*, 2009; KHAZIPOV, 2016).

O mecanismo de sinalização GABAérgico responsável pelo controle da atividade cortical, presente no tronco encefálico e núcleos da base (substância negra compacta) é mediado pelos canais K-ATP que acoplam o fluxo energético neuronal ao potencial de membrana (AMOROSO *et al*, 1990; SANTOS *et al*, 2019). O perfeito funcionamento do metabolismo e plasticidade cerebral se faz mediante fino sincronismo da atividade de sinalização GABAérgica, que por sua vez, depende de níveis ótimos de açúcar para ocorrer. Em caso contrário, se houver falha nos mecanismos de regulação de açúcar, atividades como formação de sinapses, poda neural e, fundamentalmente o controle da excitabilidade cortical estarão comprometidos de maneira severa (MARTY *et al*, 2007).

2.4.1 Canais K-ATP

Os canais K-ATP são canais iônicos que regulam o potencial de membrana através do equilíbrio negativo que é formado pela saída de íons K^+ da célula (SUN & FENG, 2013). Esses canais participam dos processos de liberação de insulina em células beta do pâncreas e na liberação do neurotransmissor GABA em neurônios GABAérgicos, sendo regulados pela razão ATP/ADP (AMOROSO *et al*, 1990; YAMADA & INAGAKI, 2002) e podendo ser encontrados em todos os tipos de células (SUN & FENG, 2013).

Nas situações em que a relação ATP/ADP é maior, eles se fecham, provocando a despolarização da membrana, liberação de Ca^{2+} citossólico por meio dos canais dependentes de voltagem, induzindo a liberação de GABA que suprimi as atividades excitatórias corticais (VETROVOY *et al*, 2017; YAMADA & INAGAKI, 2002). De forma contrária, durante períodos de estresse metabólico como em situações de hipóxia, quando há redução na produção de ATP mitocondrial provocada pelos baixos níveis de oxigênio no cérebro e privação de açúcar, esses canais permanecem abertos, com constante vazamento de K^+, mantendo a célula hiperpolarizada, sem ativação dos canais de Ca^{2+} e, consequentemente, sem a liberação de GABA (VETROVOY *et al*, 2017; YAMADA & INAGAKI, 2002). A redução da atividade GABAérgica no tronco encefálico pode culminar no desencadeamento de hiperexcitabilidade cortical promovida por neurotransmissores glutamatérgicos e, consequente morte neuronal

(DEUTCH *et al*, 2006; SANTOS *et al*, 2016; SANTOS *et al*, 2019). Além disso, em situações de convulsão, o metabolismo celular aumenta, diminuindo ainda mais a oferta de oxigênio e glicose para a célula, agravando o estresse metabólico (VETROVOY *et al*, 2017; YAMADA & INAGAKI, 2002).

A estrutura dos canais K-ATP (Figura 5) é formada por duas proteínas, Kir6.2 e SUR1, que são codificadas pelas famílias de genes KCNJ11 e ABCC8, respectivamente (SANTOS *et al*, 2019). O canal K-ATP é um complexo hetero-octamérico formado por quatro subunidades internas de Kir6.2 e quatro subunidades de SUR1 complexadas externamente, com função e expressão dependentes umas das outras (MARTIN *et al*, 2017a; SUN & FENG, 2013).

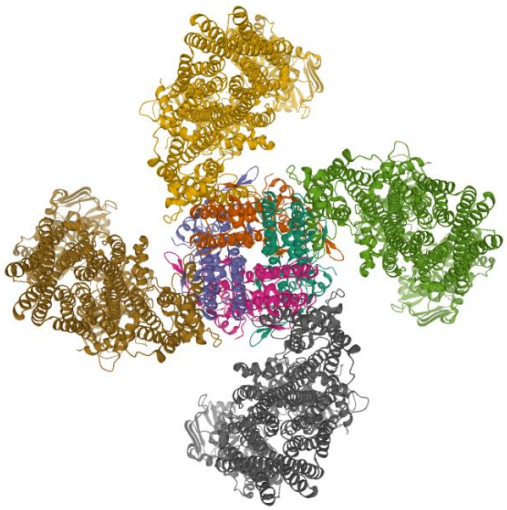

Figura 5. Canal K-ATP. O canal é um octâmero formado por quatro subunidades Kir6.2 associadas a quatro subunidades SUR1; complexo K-ATP visto do plano acima da membrana. **Fonte:** estrutura extraída do PDB (5TWV). DOI: http://doi.org/10.2210/pdb5TWV/pdb.

O tetrâmero Kir6.2 se arranja estruturalmente formando um poro por onde o íon K^+ passa, como pode ser visto na Figura 6, é o canal retificador de potássio. Essas estruturas formam uma espécie de hélices que, além de fecharem o canal, funcionam como um filtro seletivo para K^+ através de três pontos de constrição que impedem a passagem de outros íons ou do K^+ hidratado, por exemplo (MARTIN *et al*, 2017a). A subunidade Kir6.2 é uma proteína constituída por 390 aminoácidos (SEINO, 1999) que apresenta um domínio N-terminal citoplasmático, um domínio transmembranar composto por duas hélices (M1 e M2) que são intercaladas por um loop de poros e

um domínio C – terminal citoplasmático (MARTIN *et al*, 2017b). É responsável pelo fechamento e abertura do canal através da ligação ao ATP e ao PIP_2, respectivamente (NICHOLS, 2006). O acoplamento da molécula de ATP a qualquer uma das subunidades de Kir6.2 é suficiente para o fechamento do canal (SUN & FENG, 2013), sendo que a sensibilidade dessa subunidade é, em média, dez vezes maior na presença de SUR1 (MARTIN *et al*, 2017a). A ligação ao ATP envolve resíduos terminais N (Asn48 e Arg50) e C (Ile182, Lys185, Tyr330, Phe333, Gly334) (MARTIN *et al*, 2017b; NICHOLS, 2006). Na condição de canal aberto, Kir6.2 encontra-se ligado a PIP_2 na membrana através dos resíduos Arg54, Arg176, Arg177 e Arg206 (NICHOLS, 2006).

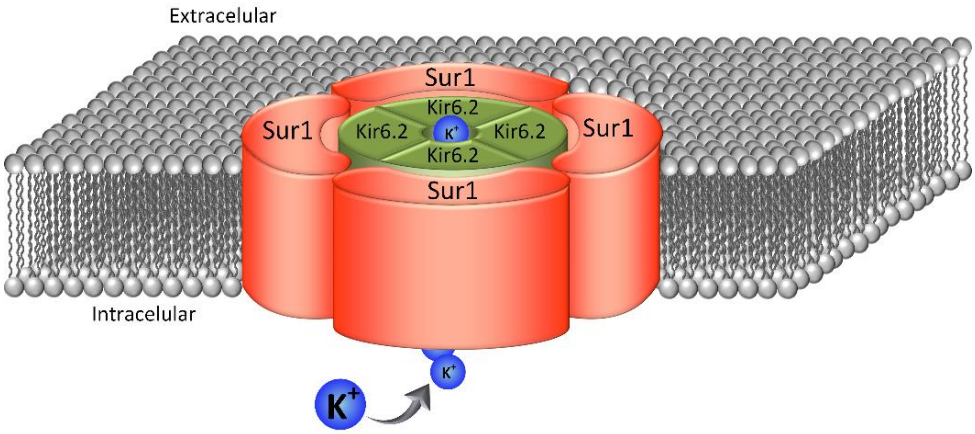

Figura 6. Estrutura do canal K-ATP. A imagem traz um esquema ilustrativo do complexo tetramérico Kir6.2 (verde) formando um poro no centro do canal por onde o íon K^+ passa. Na região externa do canal (vermelho) pode ser visto as subunidades SUR1 que apresentam a função reguladora do canal. **Fonte:** adaptado de SUN & FENG, 2013.

A parte externa de K-ATP, complexada a Kir6.2, corresponde às subunidades SUR1 (Figura 6) (MARTIN *et al*, 2017a; NICHOLS, 2006; SEINO, 1999). SUR1 pertence à família de transportadores ABC (cassete de ligação a ATP) (NICHOLS, 2006), na qual as proteínas que formam o canal transportam um substrato através da membrana com energia proveniente da hidrólise de ATP (LOCHER, 2009). No entanto, diferentemente dos outros transportadores da mesma classe, a função de SUR1 nos canais K-ATP é de regulação do canal, não apresentando atividade transportadora ou de canal iônico (MARTIN *et al*, 2017a). A estrutura de SUR1 (Figura

7) compreende um núcleo ABC que é formado por dois domínios transmembranares (TMD1 e 2) e dois domínios de ligação a nucleotídeos citoplasmáticos (NBD1 e 2); um laço intracelular (L0) e um domínio transmembranar de cinco hélices com uma extensão N – terminal (TMD0) (LI *et al*, 2017).

A ligação entre as subunidades SUR1 e Kir6.2 é realizada por meio do domínio TMD0 e, provavelmente, ocorre em dois pontos: na interação da hélice TM1 de TMD0 com a hélice M1 de Kir6.2 e através de uma conexão existente entre a região N – terminal de TMD0 com a torre Kir6.2. O domínio TMD0 interage com o núcleo SUR1 – ABC por meio de L0, que também interage com a porção N – terminal de Kir6.2, permitindo a transdução de sinal (MARTIN *et al*, 2017a).

A estrutura do núcleo SUR1 – ABC contém 12 hélices transmembranares (contendo 6 hélices cada TMD) que estão divididas pelo NBD1, representando uma dobra de ligação entre TMD1 e TMD2, finalizando com um segundo NBD2 (Figura 7) (LI *et al*, 2017; NICHOLS, 2006). O eixo do núcleo SUR1 – ABC apresenta-se inclinado com relação à membrana, com conformação que alterna para dentro e para fora provocando o movimento de TMD0 - L0 e, consequentemente, abertura (ligado ao MgADP) ou fechamento (ligado ao ATP) do canal (MARTIN *et al*, 2017a).

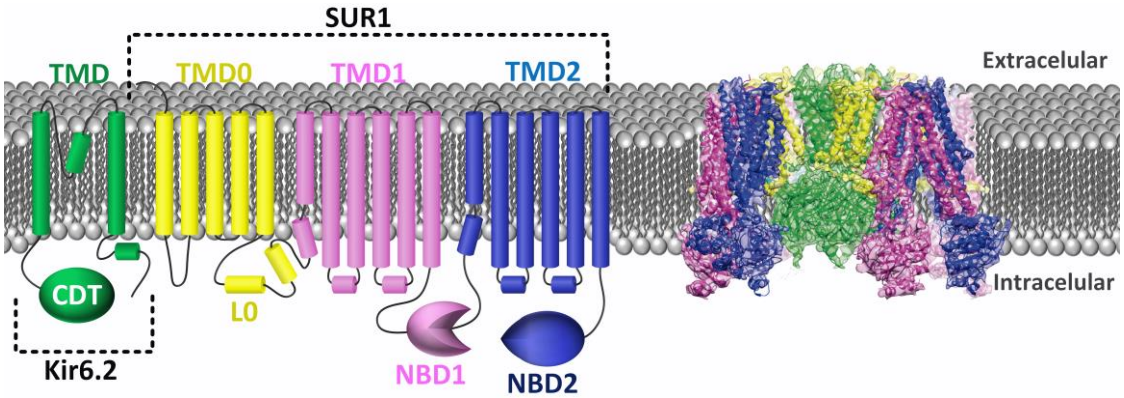

Figura 7. Estrutura de SUR1. TMD0 (amarelo): Domínio transmembranar contendo cinco hélices e uma extensão N-terminal extracelular responsável por ligar a subunidade SUR1 a Kir6.2; L0 (amarelo): laço citoplasmático localizado entre TMD0 e o núcleo SUR1, permite a transdução de sinal entre as subunidades; Núcleo SUR1 – ABC: formado pelos domínios transmembranares 1 (violeta) e 2 (azul). O domínio de ligação a nucleotídeo 1 (NBD1) faz a conexão dos TMD1 e 2 e o NBD2 aparece após TMD2. O MgADP estimula o canal por meio da ligação aos NBD1 e 2, enquanto o ATP inibe a atividade do canal ao se ligar a Kir6.2 (verde). Do lado direito da figura temos um corte vertical do canal K-ATP ilustrado em cores correspondentes a cada estrutura descrita na imagem A. **Fonte:** adaptado de LI *et al*, 2017.

Enquanto as subunidades Kir6.2 são locais de interação com ATP e PIP_2, as subunidades SUR1 interagem com nucleotídeos de Mg (MgADP e MgATP, especificamente em NBD1 e 2 como demonstrado na Figura 7) e são alvos farmacológicos (DING *et al*, 2019). A glibenclamida (GBC), por exemplo, é um fármaco pertencente a classe das sulfonilureias de segunda geração extensamente utilizada para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (MARTIN *et al*, 2017b; RUBAIY, 2016) que possui grande afinidade com o canal K-ATP (LI *et al*, 2017). Outro exemplo é o fármaco repaglinida (RPG), um hipoglicemiante oral de curta ação que pertence à classe das meglitinidas, também utilizado no tratamento da diabetes tipo 2 (DING *et al*, 2019). Além da inibição provocada pelo aumento [ATP], essas drogas hipoglicemiantes também atuam inibindo a atividade do canal K-ATP, apresentando sítio ativo no núcleo SUR1 - ABC para a GBC (MARTIN *et al*, 2017b) e locais de ligação em SUR1 com coparticipação em Kir6.2 para a RPG (DING *et al*, 2019).

Segundo estudos realizados por Martin *et al* (2017b), no qual eles comparam estruturas do canal K-ATP relatas por eles num estudo anterior (MARTIN *et al*, 2017a) e por Li *et al* (2017), o sítio ativo da GBC contido no complexo SUR1-ABC é formado por uma bolsa de ligação contendo resíduos polares e hidrofóbicos que explicam a grande afinidade pelo local. Cada oxigênio do grupo sulfonil é coordenado por um resíduo de arginina Arg1246 e Arg1300; os resíduos Thr1242 e Asn1245 coordenam os nitrogênios da fração de ureia; as hélices TM6, 7, 8 de TMD1 e TM16 de TMD2 estabilizam os grupos benzeno e ciclohexil por meio de interações hidrofóbicas. O grupo 1-cloro-4-metoxibenzeno (característico das sulfonilureias de segunda geração) apresenta o Cl ligado ao resíduo Asn437 e o grupo metoxi ligado ao resíduo Tyr377, sendo que esse mesmo resíduo interage por meio de ligações π-π com o anel benzeno. Esses mesmos autores (MARTIN et al, 2017b) sugerem uma hipótese para o mecanismo de inibição do canal K-ATP promovido pela GBC baseando-se em duas situações: na presença e na ausência de nucleotídeos de Mg. Como já foi mencionado anteriormente, a presença de MgADP/ATP envolve a mudança de conformação do núcleo SUR1 – ABC promovendo a abertura do canal (antagonizando o efeito da ligação ao ATP), entretanto, a presença da GBC altera o equilíbrio em direção ao fechamento do canal por meio da estabilização do núcleo SUR1 – ABC. Já na

ausência de MgADP/ATP, a GBC promoveria o fechamento do canal, como também reduziria a possibilidade de abertura do mesmo por meio da ligação ao feixe TM que, por estar próximo a L0, estabilizaria a região N-terminal de Kir6.2. Os estudos também demonstraram que a adição de ATP promove ainda mais o fechamento dos canais K-ATP mesmo na presença da GBC, evidenciando que a mesma não promove totalmente a inibição do canal (MARTIN *et al*, 2017b).

Um outro fármaco amplamente conhecido por inibir a atividade dos canais K-ATP é a RPG. Seu sítio de ligação está situado no complexo SUR1 – ABC com coparticipação da região N-terminal de Kir6.2 (DING *et al*, 2019). A região hidrofóbica da RPG interage com os resíduos Phe433, Leu434, Tyr377, Met441, Trp430, Val596, Leu592 e Ile381 que estão presentes em TMD1 de SUR1, além do grupo amida interagindo com o resíduo N437 nessa mesma região (também conhecido como sítio de ligação “A”). Na região TMD2 (sítio de ligação “B”) encontram-se os resíduos Asn1245 e Arg1246 coordenando o grupo carboxila e Arg1300 interagindo com o grupo carboxil da RPG (DING *et al*, 2019). Experimentos de Ding *et al* (2019) também demonstraram que a efetividade da RPG é dependente da região N-terminal de Kir6.2, sugerindo que a inibição dos canais K-ATP promovida pela RPG está relacionada com a restrição da mobilidade de N-terminal que, por sua vez, inibe as mudanças conformacionais de SUR1 promovidas por MgADP para promover a abertura do canal.

2.4.2 Tratamento da Hiperexcitabilidade Cortical

As convulsões epilépticas, que se manifestam como sintoma da hiperexcitabilidade cortical (WEI *et al*, 2017), podem ser tratadas com diversas drogas de uso bem estabelecido na prática clínica (SCHMIDT, 2009). A escolha do tratamento é individualizada de acordo ao perfil do paciente e envolve aspectos como frequência de crises convulsivas, tolerabilidade, segurança, farmacocinética, dentre outros que, quando somados, destinam-se a controlar a manifestação e recorrência de convulsões, além de melhorar a qualidade de vida do paciente, envolvendo, inclusive, aspectos sociais (SCHMIDT, 2009).

O mecanismo de ação das drogas antiepilépticas envolve basicamente duas vertentes: bloqueio de canais iônicos (principalmente canais de sódio) e potencialização da inibição GABAérgica (DECKERS *et al*, 2003). Fármacos como CBZ, fenitoína e lamotrigina, por exemplo, controlam o desenvolvimento e a propagação de crises convulsivas por meio do bloqueio dos canais de sódio de neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos, estabilizando-os e impedindo disparos repetitivos (BADAWY *et al*, 2009).

Na potencialização da inibição GABAérgica, fármacos como fenobarbital e benzodiazepínicos atuam por meio de modulação alostérica dos receptores $GABA_A$, aumentando a duração e frequência de abertura dos canais de cloro, respectivamente, mediados por GABA; a vigabatrina promove inibição irreversível da enzima GABA-transaminase (responsável pela metabolização do GABA), aumentando a concentração global de GABA e o fármaco tiagabina prolonga a presença de GABA liberado na sinapse, impedindo a captação do mesmo na fenda sináptica por meio do bloqueio do transportador de GABA 1 (DECKERS, *et al*, 2003).

Para diversas drogas antiepilépticas mais de um mecanismo de ação é proposto (Tabela 2): fármacos como felbamato e topiramato agem também reduzindo a excitação mediada pelo neurotransmissor glutamato (DECKERS, *et al*, 2003); e drogas como a oxcarbazepina, fenitoína e lamotrigina também agem em canais de cálcio (BADAWY *et al*, 2009; DECKERS, *et al*, 2003).

Apesar da liberação de GABA estar diretamente envolvida com o funcionamento dos canais K-ATP (AMOROSO *et al*, 1990), os principais mecanismos de ação estabelecido para as drogas antiepilépticas não envolvem esses canais, como pode ser observado na Tabela 2. Entretanto, estudos realizados por Devaraneni *et al* (2015) e Chen *et al* (2013), propuseram que a CBZ, além de bloquear os canais de sódio, poderia se ligar também à receptores K-ATP, inclusive competindo com um ligante padrão como a GBC (DEVARANENI *et al*, 2015) e inibir a atividade do canal (CHEN *et al*, 2013).

Tabela 2. Mecanismo de ação de fármacos antiepilépticos.

Fármaco	Canais de Na^+	Canais de Ca^{2+}	Sistema GABAérgico	Sistema Glutamatérgico
Benzodiazepínicos			X	
Carbamazepina	X			
Felbamato	X	X	X	X
Fenitoína	X	X		
Fenobarbital			X	
Gabapentina	X	X	X	
Lamotrigina	X	X		
Oxcarbazepina	X	X		
Tiagabina			X	
Topiramato	X	X	X	X
Valproato de Sódio	X	X		
Vigabatrina			X	

Fonte: Elaborada pelo autor com base em BADAWY *et al*, 2009 e DECKERS *et al*, 2003.

Partindo do pressuposto que receptores de gosto amargo estariam associados à elevação da [Ca^{2+}] em neurônios GABAérgicos (KINNAMON, 2016), decidimos testar a hipótese de que alterações funcionais nestes receptores poderiam estar no cerne da alta prevalência epiléptica no público com autismo ou pelo menos contribuir com a mesma, levando-se em consideração que indivíduos com autismo apresentam alteração na resposta sensorial e comprometimento na percepção dos gostos doce e amargo (BENNETTO *et al,*2007; UNDURTI *et al*, 2013).

Além disso, resolvemos avaliar a possibilidade de receptores de gosto amargo, que trabalham de forma interdependente com receptores de doce (LEE *et al,* 2014), serem capazes de atuar como coadjuvantes de agonistas GABAérgicos no processo de supressão da hiperexcitabilidade cortical, atuando dessa forma como agentes neuroprotetores no autismo. Para isso, avaliamos a possibilidade de um ativador de receptores TAS2, como a PTC, atuar como agonista em canais K-ATP de neurônios GABAérgicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o uso da PTC como um possível adjuvante no tratamento da epilepsia no autismo por meio da ligação aos canais K-ATP utilizando biomodelagem computacional.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar o perfil neurogenômico associado ao autismo e suas conexões com os receptores de gosto amargo e o sistema GABAérgico;
- ✓ Analisar a ontologia dos genes caracterizados no perfil neurogenômico associado ao autismo, receptores de gosto amargo e sistema GABAérgico;
- ✓ Determinar os genes hubs expressos na rede que caracteriza o perfil neurogenômico associado ao autismo, receptores de gosto amargo e sistema GABAérgico;
- ✓ Identificar o perfil de expressão cerebral de genes relacionados com os receptores de gosto amargo e o sistema GABAérgico.
- ✓ Avaliar a estrutura e interação dos canais K-ATP e seus ligantes por meio de estudos de docking molecular.
- ✓ Propor novos alvos terapêuticos realizando testes de docking molecular da PTC contra canais K-ATP.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia do trabalho teve como base a utilização de conceitos da Neurogenômica associados à ferramentas de Bioinformática e foi dividida em seis etapas:

1. Interação Gênica;
2. Enriquecimento Gênico;
3. Ontologia Gênica;
4. Análise do Perfil de Expressão Neuroanatômico;
5. Escolha do Alvo Molecular;
6. Docking Molecular.

A Bioinformática é um ramo da ciência que reúne, principalmente, conhecimentos das áreas de biologia e informática e que se desenvolveu significativamente após o sequenciamento do genoma humano, numa tentativa de reunir e aplicar as informações obtidas com os estudos da genética (BAYAT, 2002; CATTLEY & ARTHUR, 2007). Com o intuito de armazenar, analisar e correlacionar informações de diversas áreas da pesquisa, tornou-se possível desvendar mecanismos fisiológicos e patológicos com características muito próximas da realidade, simular possíveis interações biológicas e alvos de fármacos, por exemplo, além de ser possível extrapolar conhecimentos biológicos já adquiridos entre espécies diferentes (BAYAT, 2002; CATTLEY & ARTHUR, 2007). Além dessas vantagens, a bioinformática vem revolucionando a área da pesquisa por otimizar o tempo dos pesquisadores, podendo eliminar anos de estudos e experimentos em bancadas de laboratório e minimizar custos com softwares e bancos de dados online, de acesso livre e constantemente atualizados (BAYAT, 2002; CATTLEY & ARTHUR, 2007).

A Neurogenômica é a área da ciência que associa o conhecimento genético ao funcionamento do sistema nervoso (BOGUSKI & JONES, 2004). Ela traz uma perspectiva de pesquisa que associa a genética às diversas áreas de expressão cerebral, proteínas transcritas, metabolismo, fisiologia e fenótipos característicos de diversas doenças. Através desse conhecimento é possível também desenvolver novas terapias de forma mais rápida e assertiva, seja pela elucidação de novos alvos

e novas moléculas ou até mesmo numa abordagem terapêutica diferente com produtos já existentes. Existem diversos bancos de dados que dão suporte a variados ramos da pesquisa científica (BOGUSKI & JONES, 2004).

4.1 Interação Gênica

O primeiro passo da pesquisa foi identificar todos os principais genes associados à percepção do gosto doce e amargo no TEA. Para isso, iniciamos uma investigação a partir de dados oriundos do SFARI Base (https://www.sfari.org/resource/sfari-base/) (FISCHBACH & LORD, 2010).

A Iniciativa de Pesquisa em Autismo da Fundação Simons (Simons Foundation Autism Research Initiative - SFARI) consiste em uma base de dados que tem como objetivo fomentar e ampliar o mapeamento do genoma no autismo. O SFARI Base fornece uma lista a pesquisadores do mundo inteiro de forma instantânea com mais de 980 genes ranqueados a partir da associação de risco ao autismo (FISCHBACH & LORD, 2010). Nessa etapa ranqueamos os genes e sua relação com o TEA.

4.2 Enriquecimento Gênico

O passo seguinte se deu em determinar quais desses genes, em associação de risco com o autismo, estariam relacionados com a percepção do gosto doce, gosto amargo, ao processo de liberação de insulina e atividade GABAérgica. Para isso, empregamos a técnica de Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (Gene Set Enrichment Analysis – GSEA) utilizando a ferramenta ASD (http://asd.princeton.edu/) e alimentamos essa ferramenta online com os genes obtidos por meio do banco de dados do SFARI Base (KRISHNAN *et al*, 2016).

A Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes avalia a expressão diferencial de conjuntos de genes, agrupando-os por semelhanças estatísticas (SUBRAMANIAN *et al*, 2005). Trata-se de uma técnica computacional que utiliza algoritmos baseados em inteligência artificial com o objetivo de correlacionar genes e suas expressões com fenótipos característicos do TEA (KRISHNAN *et al*, 2016). Essa

caracterização é feita por meio de medidas de centralidade dos nós, de acordo com a teoria dos grafos, na qual caracteriza-se como nó cada vértice expresso na rede (no caso de redes de expressão gênica, o vértice é representado por um gene), ao qual incidem arestas que conectam uns aos outros. Um nó pode estar ligado a outros vários nós, o que determina seu envolvimento e conexão na rede, designado como grau (quanto mais nós estão conectados a um nó central, maior seu grau na rede específica). Nesse caso, a medida de centralidade leva em consideração o número de conexões que são estabelecidas em um nó (o grau de um nó), ou seja, o número de conexões que incidem por um gene na rede (OPSAHL & SKVORETZ, 2010).

Além do acesso livre, dinâmico e interativo, é possível obter também informações específicas dos genes como, por exemplo, produto de expressão, vias metabólicas associadas, incidência no TEA e grau de associação funcional entre os genes expressos (KRISHNAN *et al*, 2016). Essa etapa é fundamental na determinação dos genes com maior nível de associação funcional e com o autismo, conhecidos como genes hubs. Utilizamos um fator de corte adimensional de 0,08 (KRISHNAN *et al*, 2016).

4.3 Ontologia Gênica

A próxima etapa consistiu no estudo detalhado de cada gene expresso na rede. A ontologia gênica é uma área da bioinformática que trata dos produtos de expressão dos genes, suas funções metabólicas e componente celular representado pelos mesmos (ASHBURNER *et* al, 2000)

Realizamos esses estudos por meio de pesquisas nos bancos de dados online “Gene Ontology” (http://geneontology.org/) e “WikiGene” (https://www.wikigenes.org/app/WikiGene) (GENE ONTOLOGY, 2017; HOFFMANN, 2008) que apresentam um vocabulário unificado, baseado em evidências e com informações atualizadas sobre genes de diversos organismos. Através desses bancos de dados é possível obter informações como: produto codificado pelo gene, tipo (proteína ou enzima, por exemplo), espécies em que estão presentes, função

metabólica relacionada, dentre outras (HOFFMANN, 2008; GENE ONTOLOGY, 2017).

4.4 Análise do Perfil de Expressão Neuroanatômico

Definimos, então, as principais áreas cerebrais de expressão dos genes relacionados utilizando dados de expressão provenientes do Allen Brain Atlas (www.brain-map.org/) (HAWRYLYCZ *et al,* 2012). O Allen Brain é um banco de dados online e gratuito que contém informações relacionadas aos locais de expressão de genes-chave, informações neuroanatômicas e de conectividade (SHEN *et al,* 2012; SUNKIN, 2013).

O Allen Brain Atlas fornece informações a respeito da expressão gênica no cérebro de ratos, primatas humanos e não humanos (macaco rhesus) através de diferentes bases de dados. O “Allen Human Brain Atlas” conta com dados exclusivos provenientes de cérebro humano adulto e em desenvolvimento, integrando informações genômicas e anatômicas. As pesquisas realizadas contam com técnicas de histologia, microarray, imuno-histoquímica, ressonância magnética e imagiologia por tensor de difusão (SUNKIN, 2013).

4.5 Escolha do Alvo Molecular

A escolha do alvo para a realização do docking molecular foi feita com base na medida de centralidade de nós, por meio da qual selecionamos a proteína transcrita pelo gene hub de maior grau expresso na rede (OPSAHL & SKVORETZ, 2010). Sabendo-se que a proteína de canal SUR1 (codificada por ABCC8) atua de forma codependente com Kir6.2 (codificada pelo gene KCNJ11) nos canais K-ATP (MARTIN *et al*, 2017a), utilizamos os principais sítios ativos do canal para a realização dos estudos.

Escolhemos a PTC como ligante para o acoplamento molecular pois, além de ser um agonista padrão de receptores TAS2 amplamente citado na literatura, a PTC também pode ser facilmente encontrada em alimentos que fazem parte do nosso

cotidiano, estando presente numa gama de alimentos como as crucíferas, consequentemente, sendo de fácil acesso (BIARNÉS *et* al, 2010; IGBENEGHU *et al*, 20019; PALMER, 2018; TAN *et al*, 2012).

4.6 Docking Molecular

A última etapa do nosso estudo envolveu o docking molecular. Trata-se de uma técnica computacional que avalia o modo de interação do ligante com o receptor. Essa técnica permite a análise da melhor conformação na qual um ligante se ajusta num determinado sítio ativo, baseando-se nos aspectos físico-químicos e estruturais das moléculas (KITCHEN *et al*, 2004; PAGADALA *et al*, 2017).

O estudo de acoplamento molecular é realizado por meio de softwares de informática, que simulam o processo de acoplamento inúmeras vezes e a avaliação da interação ligante-receptor é feita por meio de cálculos de energia do sistema (até que seja alcançada a energia mínima, ΔG) e a análise de afinidade é dada em função de um score (KITCHEN *et al*, 2004; PAGADALA *et al*, 2017).

Utilizamos o software Autodock Vina que correlaciona a afinidade do receptor e do ligante com base no valor da função score (quanto menor o score, melhor a afinidade) que, por sua vez, considera aspectos como: interações estéricas, torções rotativas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Para indicar a região de acoplamento, uma caixa de grade é gerada (cubo) com base nos aminoácidos do sítio ativo indicando a localização tridimensional de interação ligante-receptor (TROTT & OLSON, 2010).

Avaliamos e quantificamos a possibilidade de interação do padrão PTC, nosso ligante de escolha, com o complexo Kir6.2/SUR1 do canal K-ATP, nosso alvo molecular. Duas moléculas inibidoras de atividade do canal K-ATP e seus respectivos sítios ativos foram utilizadas como padrão para comparação nos estudos, são elas: a GBC (MARTIN *et al*, 2017b) e a RPG (DING *et al*, 2019).

As estruturas cristalográficas do complexo Kir6.2/SUR1 do canal K-ATP foram obtidas por meio de um Banco de Dados de Proteínas conhecido como Protein Data

Bank (PDB) (https://www.rcsb.org/). O PDB é um repositório online e de acesso livre no qual estão contidas informações e estrutura tridimensional de inúmeras proteínas e ácidos nucleicos que compõem estruturas biológicas como canais iônicos, membranas, receptores, enzimas, dentre outras. As estruturas depositadas são obtidas a partir de pesquisas que utilizam técnicas como cristalografia de raio-X, RMN e microscopia eletrônica (BURLEY *et al*, 2017). As estruturas cristalográficas utilizadas na nossa pesquisa estão identificadas no banco de dados como 5TWV e 5YW7. As estruturas dos ligantes testados foram obtidas por meio do banco de dados Zinc12 (http://zinc12.docking.org/) (IRWIN & SHOICHET, 2005), sendo elas: GBC, PRG, PTC e CBZ.

O preparo das estruturas de proteínas e ligantes foi feito utilizando o Autodock Tools 1.5.6 (TROTT & OLSON, 2010) seguindo as seguintes etapas:

- ✓ Definição de uma caixa de grade para cada alvo molecular, considerando o local do sítio ativo descrito anteriormente pelos estudos cristalográficos;
- ✓ Verificação das estruturas de cada ligante em busca de torções, adição de hidrogênios polares e cálculos de protonação;
- ✓ Arquivos de todas as moléculas salvos no formato pdbqt, a fim de calcular as afinidades de energia de acoplamento (Kcal/Mol).

O Autodock Vina (TROTT & OLSON, 2010) calculou as energias de afinidade para cada complexo, gerando valores de afinidade de energia para diversas poses diferentes de acoplamento para cada ligante dentro do sítio ativo. Os resultados foram visualizados por meio dos softwares PyMol (SCHRODINGER, 2010) e Discovery Studio (DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA, 2016).

A avaliação do docking molecular é realizada por meio das interações intermoleculares existentes no complexo ligante – receptor formado. Para que uma molécula possa se ligar a um receptor é necessário que haja uma série de interações que permitam que o ligante fique acoplado por tempo suficiente e promova as mudanças necessárias, garantindo a efetividade do processo. Diversos tipos de interações intermoleculares podem ocorrer simultaneamente dentro do sítio ativo a fim de maximizar a formação do complexo ligante – receptor. Interações eletrostáticas, de

Van der Waals, hidrofóbicas, empilhamento aromático e ligações de hidrogênio, por exemplo, determinam a estabilidade do sistema que é avaliada pelo tipo e quantidade de interação presente, podendo ser caracterizadas como critérios farmacodinâmicos de estabilidade (Tabela 3) (LEMKE *et al,* 2013).

Tabela 3. Critérios farmacodinâmicos de estabilidade ligante-receptor.

Tipo de Interação ligante - receptor	Importância da interação
Interação de van der Waals	Interações que ocorrem com moléculas apolares por meio de dipolos momentâneos, também caracterizadas como interações hidrofóbicas. Geralmente ocorrem na interface do ligante e do sítio ativo, aumentando a interação e diminuindo a energia potencial do sistema.
Interações π-π, π-σ, π-alquil, π-sulfur	Essas interações estabilizam o sistema, sendo bastante comuns com frações aromáticas das moléculas. A diferença de eletronegatividade das espécies envolvidas, como acontece com π-sulfur e π-alquil, está relacionada à força de interação.
Ligação de Hidrogênio	Forte interação eletrostática que ocorre entre H e F, O ou N. A eletronegatividade desses átomos promove uma forte interação com o H, resultando num dipolo intenso, o que resulta numa interação mais forte que a de van der Waals. A estabilidade de interação ligante-receptor está relacionada a quantidade de ligações de hidrogênio conferidas à mesma.

Fonte: Elaborada pelo autor com base em LEMKE *et al,* 2013.

As interações hidrofóbicas ocorrem nas regiões apolares das moléculas, geralmente numa grande área de superfície que envolve a interface do ligante e do sítio ativo do receptor. São interações fracas, mas que ajudam na estabilidade do ligante reduzindo a energia potencial do sistema e aumentando a afinidade do mesmo dentro do sítio ativo (LEMKE *et al,* 2013).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem de novos genes expressos no TEA

Dados obtidos por meio do SFARI Base forneceram uma rede detalhada de genes possibilitando uma análise em larga escala que demonstrou diversos níveis de associação desses genes com o TEA. Dados de expressão, conectividade cortical, dentre outros, foram utilizados para criar um mapa de convergência de vias cujos genes foram ranqueados em diferentes níveis de profundidade e combinados em uma ferramenta online de GSEA conhecida como ASD (KRISHNAN *et al*, 2016). Desta fase 50 genes emergiram. O fator de corte adotado foi 0,08 o que nos permitiu reduzir os graus de liberdade para apenas 12. A aplicação da ferramenta de enriquecimento funcional e de conjunto de genes (GSEA/ASD) nos permitiu analisar o grau de associação dos genes que expressam os receptores de gosto doce e amargo no autismo à genes associados aos processos de liberação de insulina e atividade GABAérgica, principalmente, que foram expressos na rede de coexpressão gênica (Figura 8).

A rede de coexpressão gênica traz os genes representados por círculos e o tamanho desses círculos indica o grau de associação desses genes ao autismo, com uma relação diretamente proporcional (quanto maior o círculo, maior a associação do gene com o autismo). As arestas indicam se existe algum tipo de associação funcional entre os genes expressos, sendo que, quanto maior a intensidade da cor vermelha, maior a associação funcional existente entre eles (KRISHNAN *et al*, 2016).

De acordo com a rede de coexpressão gênica obtida, os genes que apresentam maior associação de risco com o autismo são: ABCC8, GABRA1, GABRB1 e APP. A maior correlação funcional está presente entre os genes ABCC8/KCNJ11, ABCC8/GABRA1 e GABRA1/TAS2R8 (Figura 8), sendo genes relacionados à atividade GABAérgica (DUKA *et al*, 2017; JOHANNESEN *et al*, 2016; SANTOS *et al*, 2019) e aos receptores de amargo (BEHRENS & MEYERHOF, 2016).

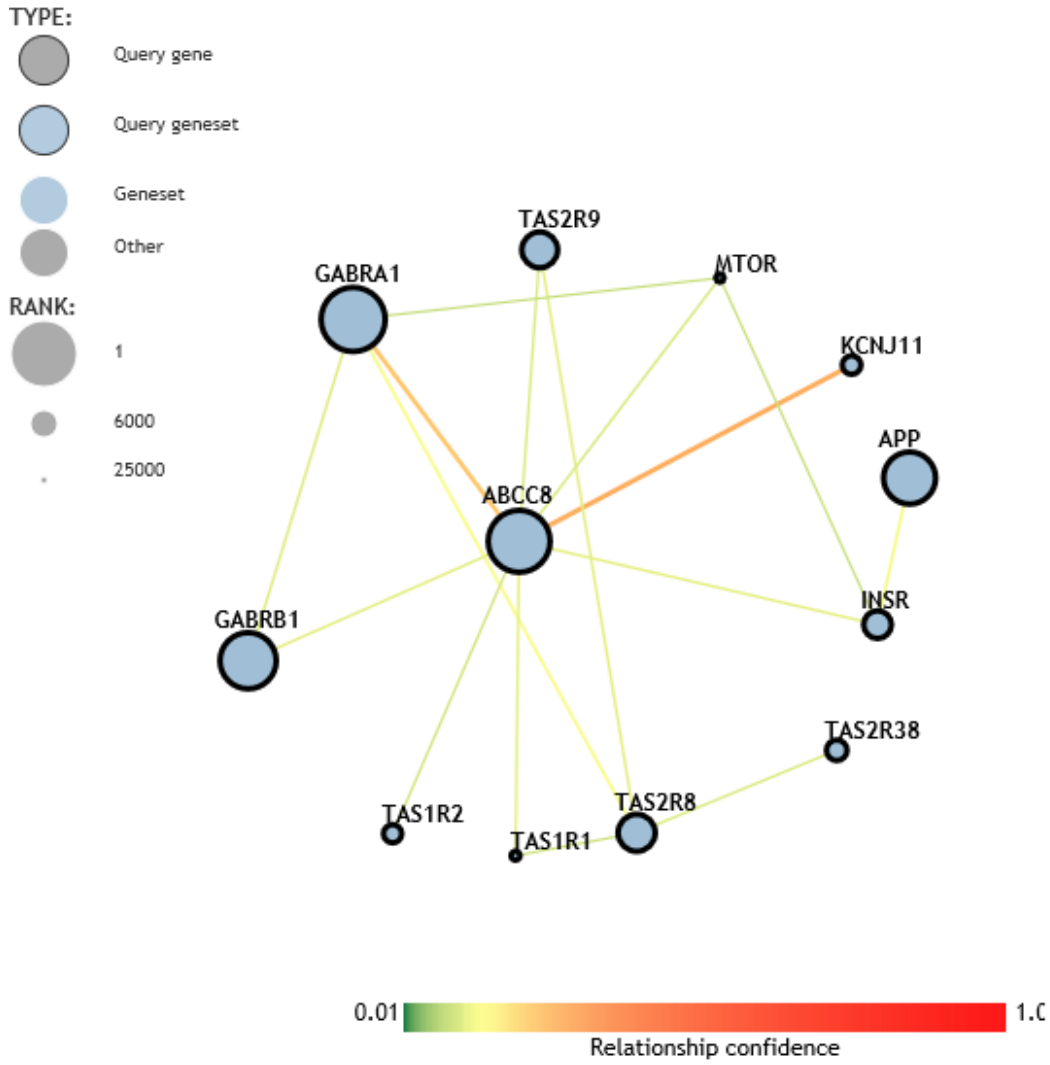

Figura 8. Rede de coexpressão gênica. A figura acima traz a rede de coexpressão gênica obtida por meio da ferramenta GSEA conhecida como ASD. A legenda apresentada no lado esquerdo da figura "TYPE" traz a correlação dos genes expressos e consultados. O "RANK", que está relacionado ao tamanho do círculo expresso, diz respeito ao score de associação de cada gene específico ao TEA: quanto maior o círculo, maior a incidência daquele gene no autismo. A barra inferior "RELATIONSHIP CONFIDENCE" traz uma escala colorimétrica representando a associação funcional entre os genes, sendo expressa pela cor e largura das linhas. **Fonte:** Resultados obtidos por meio da ferramenta GSEA/ASD.

5.2 Ontologia Gênica

Em posse desses dados, partimos para a avaliação do perfil genômico de cada um dos genes expressos na rede por meio das plataformas online "AmiGO" (ASHBURNER *et* al, 2000) e "WikiGene" (HOFFMANN, 2008). A ontologia gênica forneceu o conhecimento não só dos produtos codificados pelos genes, como também

a correlação com função molecular e local onde são expressos (OVASKA *et al,* 2008), nos permitindo uma análise criteriosa dos resultados, servindo de direcionamento para nossos estudos com base na relação funcional de cada um.

- ✓ **ABCC8 e KCNJ11:** genes que expressam proteínas formadoras dos canais K-ATP (SANTOS *et al*, 2019). Esses canais são constituídos por duas partes: uma parte interna composta por quatro subunidades de Kir6.2, codificada por KCNJ11 e formadora do poro retificador de K^+ do receptor; e quatro subunidades de SUR1, expressas pelo gene ABCC8, que constituem a parte responsável pela regulação do canal, é a subunidade receptora de sulfoniureias. Os canais K-ATP são canais iônicos presentes na membrana celular que atuam associando o metabolismo energético da célula à atividade elétrica membranar. (SUN & FENG, 2013).
- ✓ **GABRA1 e GABRB1:** são genes conhecidos por expressarem subunidades dos receptores $GABA_A$ (DUKA *et al*, 2017; JOHANNESEN *et al*, 2016). Os receptores $GABA_A$ são canais de íons cloreto presentes na membrana pós sináptica que produzem a maior parte da atividade inibitória proveniente de GABA. Eles são formados basicamente por cinco subunidades, sendo duas α, duas β e uma γ, codificados por uma gama de 19 genes diferentes que podem se estruturar de diversas formas (SIEGHART *et al*, 1999; SIMEONE *et al*, 2017). GABRA1 codifica a subunidade α_1 dos receptores $GABA_A$ (JOHANNESEN *et al*, 2016). Cerca de 60% dos receptores $GABA_A$ apresentam sua estrutura formada pelas subunidades α_1, β_2 e γ_2, sendo que as subunidades α_1 e γ_2 formam o sítio de ligação para benzodiazepínicos e α_1, especificamente, é o principal mediador da ação de drogas hipnóticas como o zolpidem (RUDOLPH & KNOFLACH, 2011). GABRB1 é o gene que codifica a subunidade β_1 de receptores $GABA_A$ (DUKA *et al*, 2017), envolvida com a transmissão sináptica inibitória desses receptores (NGUYEN & NICOLL, 2018). Variações genéticas de GABRB1 têm sido associadas a dependência alcoólica e doenças psíquicas (ANSTEE *et al*, 2013; DUKA *et al*, 2017; RUDOLPH & KNOFLACH, 2011).

- ✓ **MTOR:** do inglês “Mechanistic target of rapamycin” ou alvo mecanicista da rapamicina, é o gene que codifica uma proteína quinase Ser/Thr que atua no processo de parada do ciclo celular, além de ser alvo da rapamicina (fármaco imunossupressor) (HAY & SONENBERG, 2004). A atividade de MTOR está relacionada com crescimento, proliferação e morte celular por meio da regulação da síntese e metabolismo de proteínas, agindo direta ou indiretamente (LIPTON *et al*, 2014). Esse gene está frequentemente envolvido com o desenvolvimento de câncer (HAY & SONENBERG, 2004; KIM & GUAN, 2019), doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, além de funções como proliferação de células-tronco e plasticidade neural (LIPTON *et al*, 2014; SATO, 2016).
- ✓ **APP:** é o gene responsável pela expressão de uma proteína transmembranar denominada proteína precursora amiloide (WEINGARTEN *et al*, 2017). Essa proteína está envolvida com diversas funções, sendo algumas ainda pouco conhecidas, mas já se sabe que atuam como proteínas de adesão, na regulação do crescimento celular, componentes de ligação de metais (THINAKARAN & KOO, 2008), no desenvolvimento do circuito neuronal, dentre outras (WEINGARTEN *et al*, 2017). A APP é clivada pela ação de enzimas dando origem a dois peptídeos denominados proteína precursora de amiloide solúvel (sAPP) e peptídeo beta-amilóide (Aβ) (CAILLE *et al*, 2004). Este último está relacionado com a Doença de Alzheimer. A desregulação no processo de formação de peptídeo Aβ provoca o seu acúmulo, dando origem às placas senis, característica presente nessa patologia (DEMETRIUS *at al,* 2015; WEINGARTEN *et al*, 2017).
- ✓ **INSR:** gene responsável pela expressão da proteína denominada receptor de insulina (CIGNARELLI *et al*, 2019). O receptor de insulina é um receptor de membrana que se liga ao hormônio insulina, estimulando proteínas de transporte (GLUT’s) que medeiam o influxo de glicose na célula (HAEUSLER *et al*, 2017). Por intermédio desse receptor, o hormônio insulina atua no controle da quantidade de açúcar circulante no sangue, diferentes aspectos do metabolismo como suprimento de energia necessária para as células,

diferenciação celular e aspectos do desenvolvimento por meio da glicose (CIGNARELLI *et al*, 2019).

- ✓ **TAS1R e TAS2R:** os genes TAS1R apresentam 3 subtipos que, por meio da formação de heterodímeros, expressam receptores de gosto doce e umami (glutamato) tendo a subunidade TAS1R3 comum aos dois tipos. O receptor de gosto umami é formado pela expressão das subunidades TAS1R1 e TAS1R3, enquanto o receptor de gosto doce se apresenta pela formação de TAS1R2 e TAS1R3 (KINNAMON, 2016). Os genes TAS2R codificam a família de receptores de gosto amargo, apresentando cerca de 25 subtipos em humanos (BEHRENS & MEYERHOF, 2019). Receptores TAS são receptores de membrana acoplados a proteína G (KINNAMON, 2016), que se expressam em diversos tecidos (BEHRENS & MEYERHOF, 2011; 2019). Além de mediarem respostas gustatórias que são de suma importância para a sobrevivência e proteção dos indivíduos (BEHRENS & MEYERHOF, 2016), receptores de doce estão envolvidos também com o metabolismo energético e controle do apetite (SPAGGIARIA, 2020), assim como os receptores de amargo atuam em processos anti-inflamatórios (PIZIO *et al*, 2019) e imunológicos (BEHRENS & MEYERHOF, 2011; JI *et al*, 2014).

Com base nos resultados da rede de coexpressão e na avaliação do perfil genômico, a correlação dos genes foi feita de acordo a expressão e relação funcional de cada um. A relação dos genes ABCC8 e KCNJ11, expressa na rede, é bem conhecida por ambos codificarem subunidades formadoras dos canais K-ATP (SANTOS *et al*, 2019) que são codependentes para expressão e função (MARTIN *et al*, 2017a). Esses canais são amplamente encontrados em células β-pancreáticas e neurônios GABAérgicos (AMOROSO *et al*, 1990). O fato da liberação de GABA estar diretamente relacionada com a atividade dos canais K-ATP e a presença deles ser predominantemente em neurônios GABAérgicos (SUN & FENG, 2013), os colocam numa estreita relação com os genes GABRA1 e GABRB1 que codificam subunidades formadoras de receptores de GABA, α-1 e β-1, respectivamente (JOHANNESEN *et al*, 2016; DUKA *et al*, 2017). O comprometimento na efetividade da subunidade SUR1 codificada pelo gene ABCC8 (SUN & FENG, 2013), responsável pela regulação do

canal (MARTIN *et al*, 2017a), afetaria o seu funcionamento, bem como o de neurônios GABAérgicos. Essa interação correlaciona as atividades dos canais K-ATP com o controle da hiperexcitabilidade neuronal, dependente da ação de GABA que, por sua vez, é liberado com o aumento da concentração de cálcio intracelular proveniente do fechamento de K-ATP (AMOROSO *et al*, 1990). Em outras palavras, a ineficiência desses canais compromete o controle da atividade excitatória e inibitória dos neurônios. Os genes GABRA1 e GABRB1 juntamente com ABCC8 são genes hubs que expressam alta correlação com TEA como pode ser visto na Figura 8, o que sugere uma possível associação com comorbidades como a epilepsia (consequência da hiperexcitabilidade neuronal) que é tão presente nesse grupo. O gene ABCC8, além dessa associação, encontra-se no centro da rede, apresentando forte associação funcional aos outros genes.

Nossas análises também demonstraram a expressão de genes TAS2R no TEA e a relação funcional com os genes GABRA1 e ABCC8 na rede (Figura 8). Esse nível de associação foi importante para o embasamento e seguimento do estudo proposto inicialmente, já que a ativação de TAS2R, por intermédio de GPCR's, provocaria o aumento [Ca^{2+}] intracelular (KINNAMON, 2016) que, por sua vez, poderia atuar como coadjuvante na liberação de GABA e ter relação funcional com os genes que codificam os receptores de GABA (GABRA1) e o canal K-ATP (ABCC8), consequentemente.

Na Tabela 4 temos a comparação dos genes expressos 2 a 2 com atribuição de um peso que caracteriza a relação funcional entre eles, sendo que, quanto maior o peso, maior essa relação (KRISHNAN *et al*, 2016). Como exemplo, temos os genes KCNJ11 e ABCC8 que apresentam a maior relação funcional dentre os descritos na tabela, corroborando com os dados que já foram citados anteriormente a respeito da codependência dos mesmos para expressão e função (MARTIN *et al*, 2017a). Destacam-se também a estreita relação envolvendo os genes que expressam a subunidade α-1 de receptores GABA, com receptores TAS2, subtipo oito e três, além da relação entre os genes ABCC8 e TAS2R9.

Tabela 4. Relação funcional entre os genes e seus respectivos scores

Gene1	Gene2	Peso
TAS1R3	TAS2R38	93
TAS1R3	KCNJ11	111
TAS1R3	GABRA1	97
TAS1R3	TAS2R8	94
TAS1R3	ABCC8	122
TAS1R3	TAS2R9	96
TAS1R3	INSR	108
TAS1R3	TAS2R3	89
TAS1R3	TAS1R2	19
TAS1R3	TAS1R1	233
TAS1R3	SCN1A	9
TAS2R38	TAS2R8	103
TAS2R38	SCN1A	84

Gene1	Gene2	Peso
KCNJ11	ABCC8	274
GABRA1	TAS2R8	144
GABRA1	ABCC8	23
GABRA1	TAS2R3	173
TAS2R8	TAS2R9	114
TAS2R8	TAS2R3	162
TAS2R8	TAS1R1	87
ABCC8	TAS2R9	105
ABCC8	INSR	115
ABCC8	TAS2R3	19
ABCC8	TAS1R2	93
ABCC8	TAS1R1	115
TAS2R9	TAS2R3	109

Fonte: Resultados obtidos por meio da ferramenta GSEA/ASD.

5.3 Perfil de Expressão Gênica

Utilizando o Allen Brain Atlas (HAWRYLYCZ, 2012), analisamos o perfil de expressão gênica por meio de hibridização in situ dos receptores TAS2 com neurônios receptores de GABA. De acordo com a Figura 9 é possível observar que há um processo de coexpressão com sobreposição espacial de ambas as famílias de genes, reforçando nossa hipótese de participação comum nas mesmas vias metabólicas.

Receptores TAS2 e GABAérgicos são expressos nas mesmas células de acordo com a imuno-histoquímica. A presença desses receptores em neurônios GABAérgicos trazem indícios de que receptores TAS2 poderiam agir como coadjuvantes na despolarização desses neurônios através do aumento de cálcio citoplasmático proveniente de sua ativação.

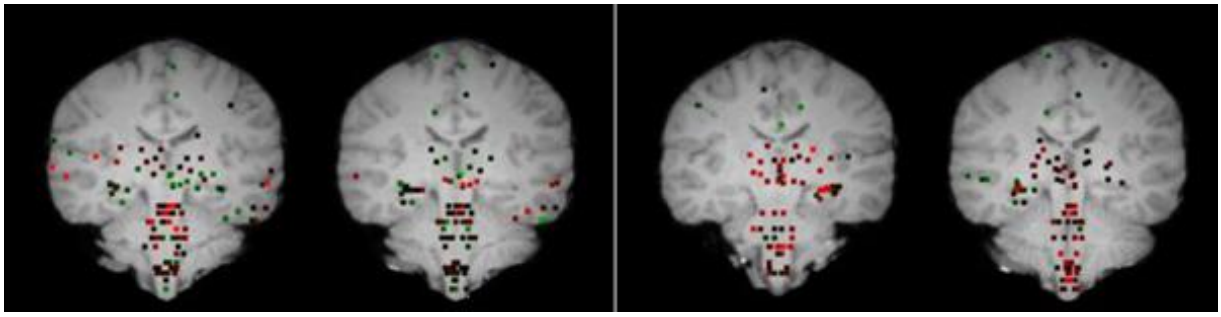

Figura 9. Sobreposição da expressão gênica de TAS2R, GABARB1 E GABRA1 no tronco encefálico. Acima temos imagens obtidas a partir do Allen Brain nas quais é possível observar a expressão gênica por técnica de hibridização in situ. À esquerda, expressão de receptores da família TAS2R (amargo). Nas duas últimas imagens da direita temos a expressão de receptores GABAérgicos. O vermelho indica alta intensidade de expressão. Como podemos ver, em ambos os casos, a maior expressão se encontra na formação reticular, sede do controle de ativação cortical.

5.4 Escolha do Alvo Molecular

A determinação da relação funcional dos genes da rede é realizada por meio da medida de centralidade, da qual obtemos os genes principais ou centrais, os chamados genes hubs. Conforme foi visto na Seção 2.4.4, de acordo com a teoria de grafos, a medida de centralidade está relacionada com o grau que determinado nó apresenta, ou seja, ela é calculada em função do número de arestas que incidem sobre um nó (OPSAHL & SKVORETZ, 2010). O perfil genômico revelou quatro genes hubs, entretanto, a medida de centralidade colocou o gene ABCC8 com o mais alto grau, tornando-o nosso alvo para o docking. ABCC8 codifica a proteína SUR1 (subunidade formadora de K-ATP), como já foi descrito, e aparece fortemente correlacionada com a expressão do autismo e funcionalmente com TAS2R9 (subunidade do receptor de gosto amargo), como pode ser observado na Figura 8. O elo existente entre os genes ABCC8, GABRA1 e TAS2R subtipos nove e 38 corroboram com a hipótese sugerida de que seus produtos de expressão estão associados, no qual o aumento da [Ca^{2+}] citossólico proveniente da ativação dos receptores de amargo atuaria na liberação de GABA nos mesmos neurônios, nos levando a sugerir que pudesse haver uma ligação entre os ativadores de TAS2 (por exemplo, PTC) e SUR1. Sabendo-se que SUR1 atua de forma codependente com Kir6.2 (expressa por KCNJ11) (MARTIN *et al*, 2017a), nossa escolha envolveu todo o complexo Kir6.2/SUR1 do canal K-ATP. A escolha da PTC como ligante teve como

critério o fato de ser um agonista de TAS2R amplamente conhecido e citado em estudos, além de ser um produto natural encontrado facilmente em alimentos presentes no nosso cotidiano (BIARNÉS *et* al, 2010; IGBENEGHU *et al*, 20019; PALMER, 2018; TAN *et al*, 2012).

5.5 Docking Molecular

A última etapa da nossa investigação envolveu o estudo de docking molecular, por meio do qual avaliamos e quantificamos a possibilidade de interação da PTC com o complexo Kir6.2/SUR1 do canal K-ATP. Dois inibidores de atividade do canal K-ATP e seus respectivos sítios ativos foram utilizados como padrão para comparação nos estudos: a GBC (MARTIN *et al*, 2017b) e a RPG (DING *et al*, 2019).

5.5.1 Docking envolvendo o sítio ativo da GBC no complexo Kir6.2/SUR1

Em nosso primeiro estudo envolvendo o docking, colocamos nosso ligante teste (PTC) frente ao sítio ativo da GBC, que se concentra no complexo SUR1 – ABC (MARTIN *et al*, 2017b), bem como a droga padrão.

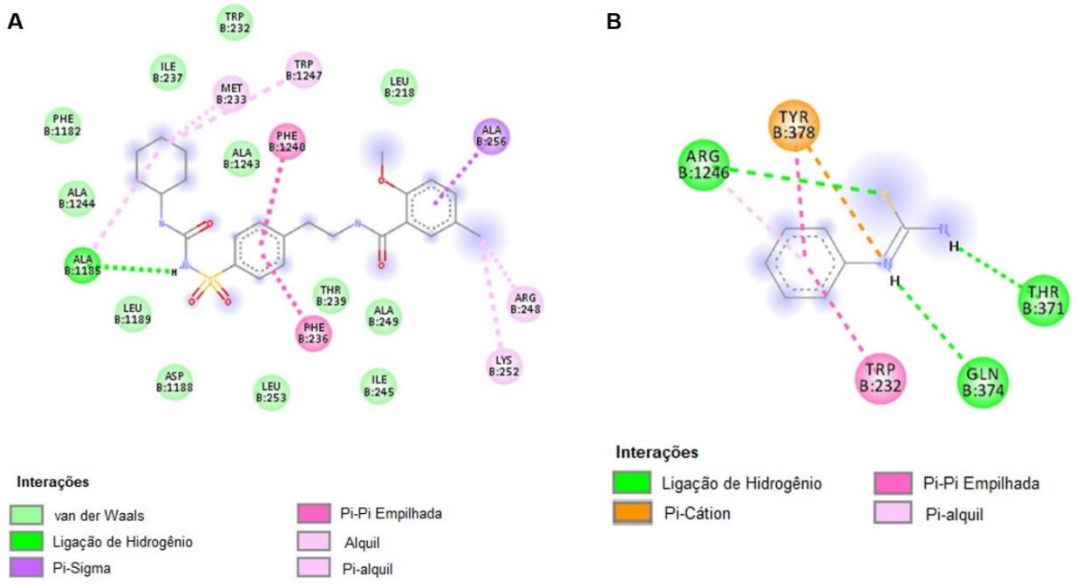

Figura 10. Mapa 2D e de potencial interação da GBC (A) e PTC (B) no sítio ativo do complexo SUR1 - ABC.

É possível observar no mapa 2D que diversos tipos de interações envolvem a ligação da GBC ao complexo SUR1 – ABC (Figura 10A), a energia de afinidade dessa ligação é de -8,4 Kcal/Mol. Os grupos benzenos são estabilizados por meio de interações π-σ (Ala256) e π-π (Phe1240 e Phe236). O Cloro ligado à fração metoxi-benzeno interage com os aminoácidos Arg248 e Lys252 por meio de interações alquil. O grupo ciclohexil é estabilizado por meio de uma interação π-alquil com o aminoácido Trp1247 e uma ligação de hidrogênio ocorre entre uma fração nitrogenada e o aminoácido Ala1185.

A PTC, por sua vez, se acopla no sítio ativo SUR1 - ABC por meio de 3 ligações de hidrogênio que ocorrem na fração tioureia: os aminoácidos Thr371 e Gln374 ligados a um átomo de nitrogênio cada e Arg1246 ligada ao átomo de enxofre. O grupo fenil é estabilizado por meio de duas interações π-π que ocorrem com os aminoácidos Trp232 e Tyr378, sendo que esse último se liga também a um nitrogênio da fração tioureia por meio de uma interação π-Cátion, como pode ser observado na Figura 10B. A energia de afinidade da PTC no sítio ativo da GBC é de -4,9 Kcal/Mol.

5.5.2 Docking envolvendo o sítio ativo da RPG no complexo Kir6.2/SUR1

O sítio ativo da RPG no canal K-ATP está compreendido entre o complexo SUR1–ABC tendo coparticipação da região N-terminal de Kir6.2 (DING *et al*, 2019).

Iniciamos o estudo desse sítio ativo com o docking do padrão RPG, no qual obtivemos uma energia de afinidade de -8,2 Kcal/Mol. O mapa 2D do complexo RPG - Kir6.2/ SUR1 (Figura 11A) mostra claramente as interações que ocorrem com os aminoácidos do sítio ativo. Ligações de hidrogênio envolvem os aminoácidos Tyr377 e Asn437 com grupos carbonilas. Uma ligação π-alquil ocorre com o aminoácido Trp1297, enquanto interações π-σ (Thr588) e π-alquil (Leu373) ocorrem com a fração aromática, melhorando a estabilidade do ligante no sítio ativo. Interações de van der Waals concentram-se na região mais apolar do ligante. Do lado direito da Figura 11 temos o mapa de hidrofobicidade (Figura 11B), no qual a região azulada compreende as áreas mais hidrofóbicas do sistema que contribuem para a estabilidade da ligação

e diminuem a energia potencial. E, ainda, o mapa expressando as ligações de hidrogênio (Figura 11C) caracterizando as regiões onde estão presente as frações aromáticas como os principais doadores de elétrons.

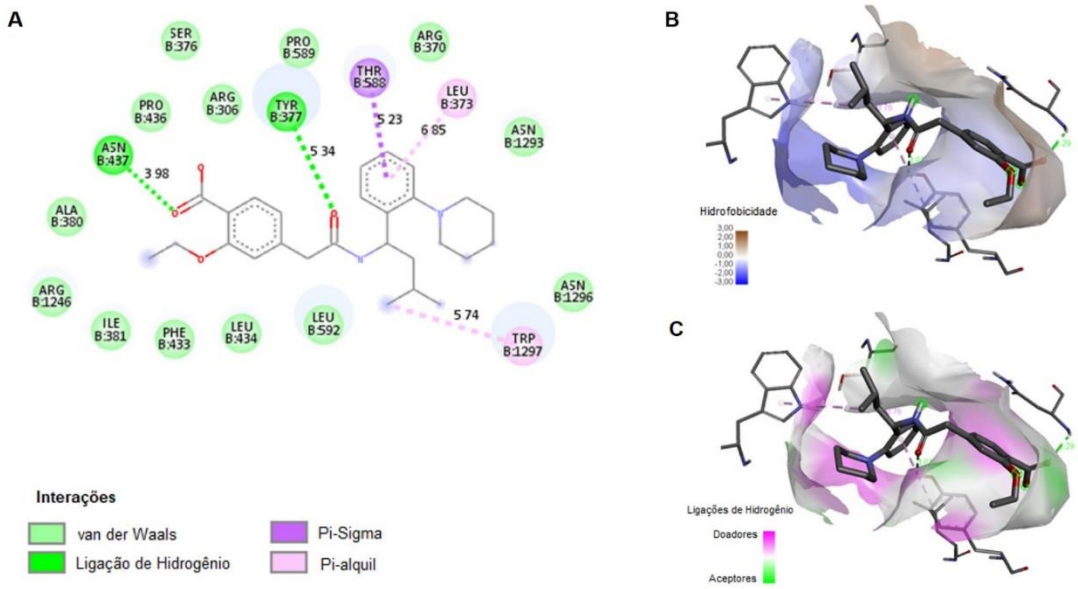

Figura 11. Mapa 2D e de potencial interação da RPG no sítio ativo do complexo Kir6.2/SUR1.

5.5.2.1 Docking da GBC no complexo Kir6.2/SUR1

Sabendo-se que a GBC e a RPG promovem a inibição do canal K-ATP por meio de sítios ativos diferentes (DING *et al*, 2019; MARTIN *et al*, 2017b), fizemos um estudo de acoplamento da GBC no sítio ativo da RPG a fim de verificarmos a possibilidade e o comportamento das interações. Os sítios ativos dessas drogas compartilham algumas regiões específicas no núcleo SUR1 – ABC, no entanto, a coparticipação da região N – terminal de Kir6.2 é fundamental para que a RPG promova a inibição da atividade do canal K-ATP (DING *et al*, 2019), o que não acontece na interação da GBC em seu sítio ativo específico (MARTIN *et al*, 2017b).

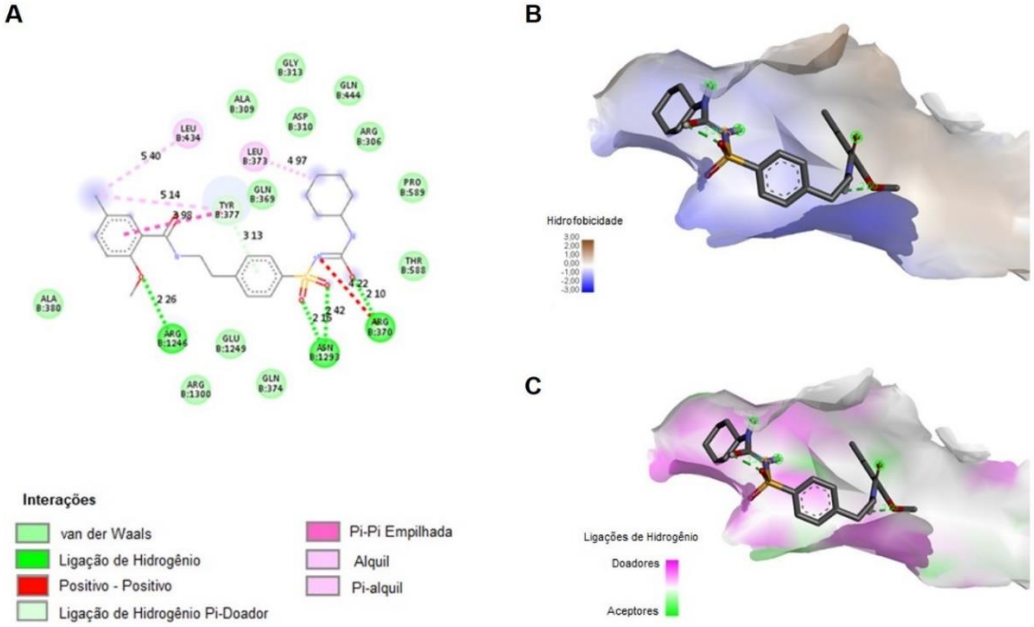

Figura 12. Mapa 2D e de potencial interação da GBC no sítio ativo da RPG no complexo Kir6.2/SUR1.

Segundo os resultados do docking molecular, a GBC apresentou uma energia de ligação de –9,0 Kcal/Mol, se ligando ao sítio ativo da RPG no canal K-ATP (Figura 12A) por meio de ligações de hidrogênio que envolvem os aminoácidos Arg1246 e o grupo metoxi, Asn1293 coordenando cada oxigênio do grupo sulfonil e Arg370 ligado ao oxigênio da fração nitrogenada. A fração 1-Cl-4-metoxi-benzeno tem o Cl fazendo interações do tipo alquil com os aminoácidos Leu434 e Tyr377, sendo que esse último também interage através de emparelhamento π-π com o grupo benzeno dessa fração. O grupo ciclohexil é estabilizado por meio de interações π-alquil com o resíduo Leu373. Interações de van der Waals são predominantes na região mais apolar da molécula, que está bem caracterizada no mapa de hidrofobicidade representado na Figura 12B. O mapa de ligações de hidrogênio (Figura 12C) traz grandes áreas com doadores, sendo muito mais expressas do que regiões aceptoras de elétrons.

5.5.2.2 Docking da PTC no complexo Kir6.2/SUR1

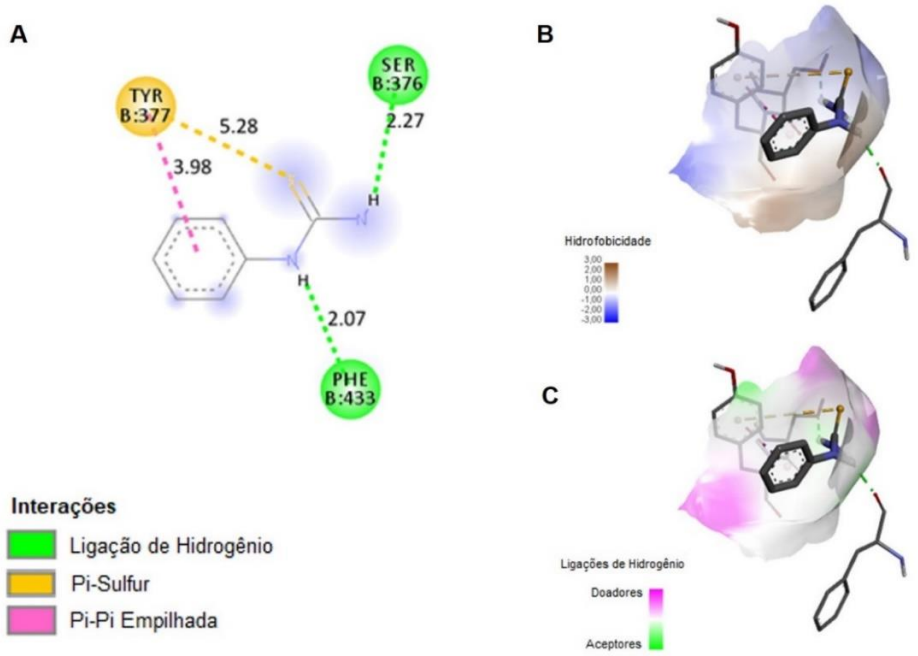

Figura 13. Mapa 2D e de potencial interação da PTC no sítio ativo da RPG no complexo Kir6.2/SUR1.

Testamos a PTC no sítio ativo da RPG no canal K-ATP que apresentou energia de afinidade de -6,0 Kcal/Mol. A PTC é uma molécula que apresenta uma estrutura significativamente menor que a RPG e faz fortes interações no sítio ativo de SUR1/Kir6.2 (Figura 13A). A eletronegatividade das frações nitrogenadas da PTC é responsável por ligações de hidrogênio com os aminoácidos Ser376 e Phe433 que chegam a uma ordem de 2,27Å e 2,07Å, respectivamente. No mapa 2D é possível visualizar também que o aminoácido Tyr377 se liga à PTC na fração aromática por meio de uma interação π-π e ao grupo carbonila por meio de uma interação π-Sulfur, aumentando a estabilidade da molécula no sítio ativo, como foi visto na Seção 2.4.6.1. Contribuindo também com a estabilidade do complexo, temos o mapa de hidrofobicidade (Figura 13B) mostrando a formação de uma bolsa ao redor da PTC. Os grupos doadores de elétrons estão representados pelas frações aromáticas da PTC, observados na Figura 13C.

Uma vez demonstrada a afinidade da PTC pelo sítio ativo da RPG no canal K-ATP, precisávamos, então, saber se esses canais participariam de processos de redução da hiperexcitabilidade cortical em condições de estresse metabólico, como acontece em situações de hipóxia ou anóxia diante de drásticas reduções dos níveis energéticos no organismo, por exemplo. Para isso, testamos uma droga padrão de ação anticonvulsivante com uso bem estabelecido na terapêutica: a CBZ (BADAWY *et al*, 2009; DECKERS, *et al*, 2003).

5.5.2.3 Docking da CBZ no complexo Kir6.2/SUR1

A CBZ é um fármaco anticonvulsivante amplamente utilizado na prática clínica (BADAWY *et al*, 2009; DECKERS, *et al*, 2003) e que, mesmo não apresentando estrutura relacionada com moléculas que se ligam nos canais K-ATP como a GBC e RPG, já foi reportada como um ligante desses canais, inclusive, de ação inibitória (CHEN *et al*, 2013; DEVARANENI *et al*, 2015).

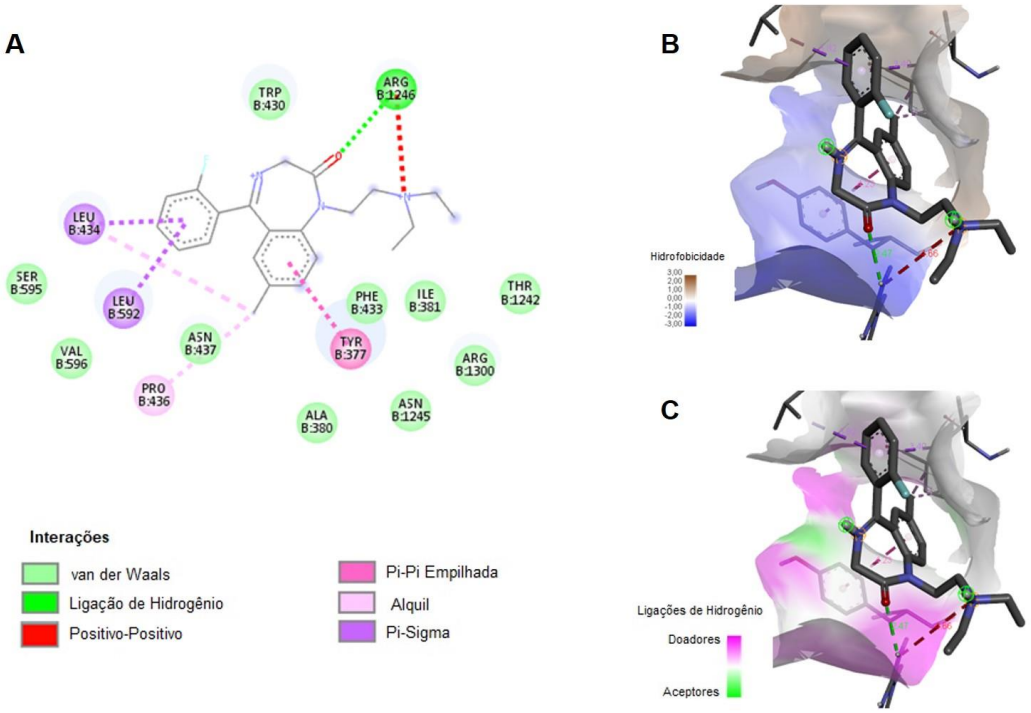

Figura 14. Mapa 2D e de potencial interação da CBZ no sítio ativo da RPG no complexo Kir6.2/SUR1.

De fato, a CBZ interagiu com o sítio ativo da RPG apresentando energia de afinidade de -7.4 Kcal/Mol. O diagrama 2D (Figura 14A) mostra que a CBZ em sua melhor conformação apresenta três pontos fundamentais de afinidade. Uma ligação de hidrogênio une o aminoácido Arg1246 ao grupo carbonila presente na molécula, ao mesmo tempo que interage com a fração nitrogenada. As frações aromáticas são estabilizadas por meio de ligações π-σ envolvendo os aminoácidos Leu434 e Leu592, e π-π com o aminoácido Tyr377. A região mais apolar da molécula é estabilizada no sítio ativo por meio de interações de van der Waals. Na Figura 14B, temos o diagrama da região com interações hidrofóbicas que contribuem com as forças de ligação entre a CBZ e o receptor. A área marrom do diagrama expressa a região que apresenta maior hidrofobicidade. No diagrama de ligações de hidrogênio (Figura 14C), temos os grupos doadores caracterizados pelas frações aromáticas presentes na molécula.

Realizamos o acoplamento concomitante da RPG, GBC, PTC e CBZ no sítio ativo da RPG. Nesse estudo a análise foi feita com todos os ligantes ocupando o mesmo sítio ativo como uma forma de comprovar a ação.

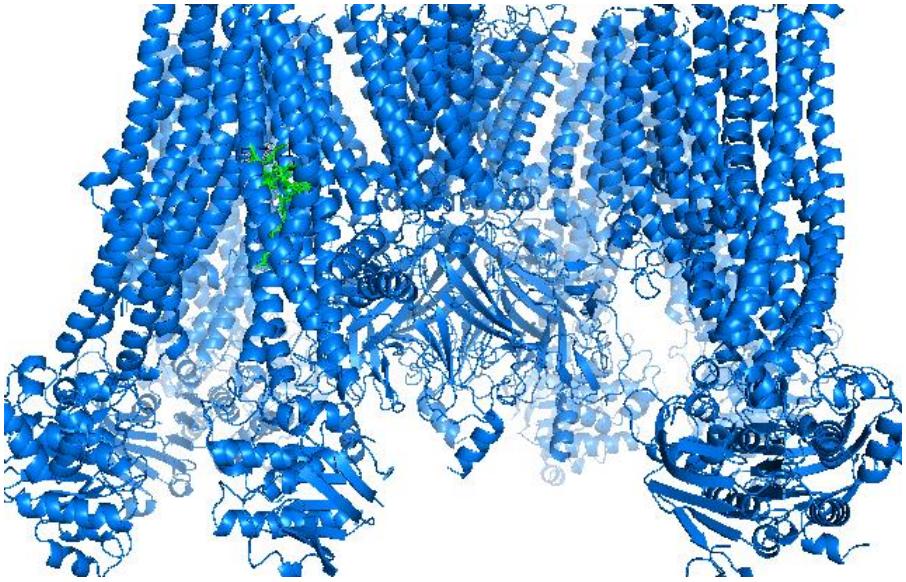

Figura 15. Representação do docking concomitante dos ligantes RPG, GBC, PTC e CBZ (verde) no sítio ativo da RPG (complexo Kir6.2/SUR1).

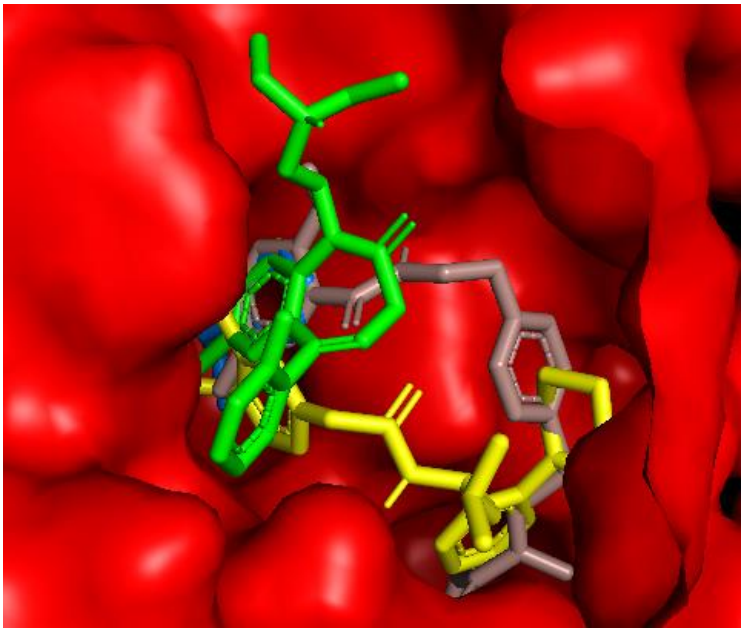

Figura 16. Docking molecular no sítio ativo da RPG no canal K-ATP. Nessa figura temos RPG (amarelo), GBC (cinza), PTC (azul) e CBZ (verde), todas ocupando o mesmo sítio no complexo Kir6.2/SUR1.

5.5.3 Análise do docking molecular envolvendo o canal K-ATP

Uma vez demonstrada afinidade da PTC nos canais K-ATP, no qual obtivemos uma energia de -6,0 Kcal/Mol ao realizar o docking no mesmo sítio ativo onde a RPG se liga, comparada a uma energia de -8,2 Kcal/Mol desse mesmo padrão, precisávamos, então, saber se seria possível os canais K-ATP participarem de processos de redução da hiperexcitabilidade cortical em circunstâncias de estresse metabólico (situações de hipóxia ou anóxia, por exemplo). Os canais K-ATP participam do processo de liberação de GABA em neurônios GABAérgicos (AMOROSO *et al*, 1990), no entanto, as principais terapias medicamentosas utilizadas na clínica para o tratamento da epilepsia não têm essa via como um alvo (BADAWY *et al*, 2009; DECKERS, *et al*, 2003), como pode ser observado na Tabela 2.

A CBZ é um fármaco utilizado na terapêutica para epilepsia que tem como principal mecanismo de ação o bloqueio dos canais de sódio (BADAWY *et al*, 2009). A escolha desse fármaco antiepiléptico para nosso estudo foi feita com base no amplo uso na terapêutica e no fato dessa droga já ter sido reportada como ligante dos canais

K-ATP (CHEN *et al*, 2013; DEVARANENI *et al*, 2015). A CBZ se ligou no mesmo sítio ativo da RPG com uma energia de ligação de -7,4 Kcal/Mol, demonstrando excelente afinidade com valor muito próximo ao do padrão RPG. Esses resultados sugerem um mecanismo de ação *off label* para a CBZ, no qual, além de tratar a epilepsia por meio do bloqueio de canais de sódio, a mesma poderia também ter uma ação coadjuvante nos canais K-ATP, contribuindo para a redução da hiperexcitabilidade cortical com o bloqueio do complexo Kir6.2/SUR1 que culmina no aumento da liberação de GABA. Mais estudos são necessários para aprofundamento, como testes em culturas de células e avaliação em modelo animal.

Com base nesses dados, a afinidade da PTC pelo complexo Kir6.2/SUR1 do canal K-ATP sugere que essa substância pode ter um efeito farmacológico para atuar no controle da hiperexcitabilidade cortical e, consequentemente, no tratamento da epilepsia no autismo. A hiperexcitabilidade cortical relacionada aos canais K-ATP apresenta dois caminhos: ela é causada porque o canal não se fecha, mantendo a célula hiperpolarizada por consequência do extravasamento de K^+ e porque não há liberação de Ca^{2+} e, consequentemente, de GABA (BADAWY *et al*, 2009; VETROVOY *et al*, 2017; YAMADA & INAGAKI, 2002). Diante disso, propomos que o acoplamento molecular da PTC nos canais K-ATP é capaz de relacionar esses dois benefícios: despolarização celular e liberação de GABA, ambas mediadas pelo mesmo local, sugerindo, inclusive, mecanismos de ação sinérgicos.

A proposta da utilização da PTC na terapêutica da epilepsia agrega outros benefícios como o fato de ser um produto natural facilmente encontrado em diversos alimentos e vegetais crucíferos (DREWNOWSKI *et al*, 2001) e, provavelmente, já fazer parte da dieta de muitos pacientes. O fácil acesso e a melhor aceitação de um produto natural que agrega tantos benefícios potencializa a busca de novos estudos e meios diversos de utilização.

Outro ponto importante a ser considerado envolve a farmacorresistência desenvolvida por pacientes que fazem uso de drogas antiepilépticas e os efeitos colaterais provocados por esses tratamentos. A tolerância adquirida pelo paciente com o passar do tempo pode atenuar os efeitos colaterais como também reduzir a efetividade do tratamento, sendo necessária a intervenção com outras drogas ou

associações (SCHMIDT, 2009). Tratando-se da epilepsia em indivíduos autistas temos ainda mais fatores a serem considerados como, por exemplo, outras comorbidades associadas e as possíveis dificuldades de intervenção relacionadas a esses pacientes, tornando a busca por alternativas terapêuticas ainda mais importante.

A metodologia aplicada permitiu identificar a correlação genética presente no autismo e em duas manifestações clínicas comumente encontradas nesse grupo, que são: a epilepsia (hiperexcitabilidade cortical) e alteração da resposta sensorial desses indivíduos. Por meio do estudo neurogenômico identificamos a presença e o nível de correlação funcional existente nos genes que expressam as subunidades formadoras do canal K-ATP (ABCC8 e KCNJ11) envolvidas na liberação de GABA e controle da hiperexcitabilidade cortical, receptores de gosto amargo (TAS2R) e o sistema GABAérgico (GABRA1 e GABRB1). A análise ontológica permitiu observarmos interações, formas e vias metabólicas com a qual os produtos de expressão desses genes estariam relacionados.

Corroborando com os dados neurogenômicos e ontológicos, tivemos a avaliação do perfil de expressão cerebral dos genes de gosto amargo e neurônios receptores de GABA que demonstraram a coexpressão desses genes nas mesmas regiões cerebrais. A medida de centralidade da rede determinou ABCC8 como gene hub e nosso alvo para o docking molecular. A escolha da PTC como ligante envolveu aspectos relacionados não só ao fato de ser um agonista de TAS2R, mas também por se tratar de um produto natural e de fácil acesso.

Os estudos de acoplamento realizados no canal K-ATP demonstraram que a PTC apresenta excelente afinidade no sítio ativo da RPG quando comparada ao padrão que induz o fechamento do canal K-ATP nesse mesmo local. A avaliação comparativa com a droga antiepiléptica CBZ propõem um mecanismo de ação *off label* dessa droga, assim como, reforça a possibilidade da PTC se tratar de uma possível alternativa para o tratamento da hiperexcitabilidade cortical. As ferramentas de neurogenômica e bioinformática utilizadas são os primeiros passos que sugerem novos alvos terapêuticos para o tratamento da epilepsia em pacientes autistas, sendo necessário o prosseguimento da pesquisa por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos no decorrer desse trabalho, demonstramos que os genes que expressam as proteínas formadoras dos canais K-ATP, os receptores de gosto amargo e os receptores GABAérgicos estão relacionados funcionalmente e, provavelmente, sendo mais exacerbados em indivíduos com autismo. Com base na proposta de utilizar uma molécula que seja agonista dos receptores de gosto amargo, foi possível demonstrar, por meio de estudos neurogenômicos e docking molecular, que a PTC se liga aos canais K-ATP no mesmo sítio de ligação onde a RPG e GBC, bloqueadores desse mesmo canal (K-ATP) agem, podendo ser, portanto, uma possibilidade de tratamento coadjuvante para a epilepsia no autismo. Essa descoberta é reforçada pelos estudos de acoplamento que realizamos com a CBZ, um anticonvulsivante padrão que age, principalmente, por meio dos canais de sódio, mas que também se liga no mesmo sítio ativo da PTC, demonstrando um mecanismo de ação *off label* para a CBZ, reforçando a proposta de um mecanismo de ação anticonvulsivante para a PTC.

REFERÊNCIAS

AMOROSO, S.; SCHMID-ANTOMARCHI, H.; FOSSET, M;, ANDLAZDUNSKI, M. Glucose, sulfonylureas and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K^+ channels. **Science**, vol. 247, p. 852–854, 1990.

ANSTEE, Q.; KNAPP, S.; MAGUIRE, E. *et al.* Mutations in the *Gabrb1* gene promote alcohol consumption through increased tonic inhibition. **Nat Commun**, vol 4, n. 2816, 2013.

APA, American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statistical Manual os Mental Disorders (DSM-5)**. Ed. 5. Washington, DC: American Psychiatric Association Publishing, 992, 2013.

ASHBURNER, M.; BALL, C.; BLAKE, J. *et al*. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genet**, vol. 25, n. 1, p. 25–29, 2000.

AUVIN, S.; DOZIÉRES-PUYRAVEL, B.; LOUSSOUARN, A. Epilepsy and autistic spectrum disorders: Diagnostic challenges and treatment consideration. In: MULA, M. **The Comorbidities of Epilepsy**. Elsevier, p. 389 – 395, 2019.

BADAWAY, R.; HARVEY, A.; MACDONELL, R. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: Understanding the mechanisms of epilepsy – Part 1. **Journal of Clinical Neuroscience**, vol. 16, p. 355 – 365, 2009.

BAIO, J.; WIGGINS, L.; CHRISTENSEN, D.L. *et al*. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. **MMWR Surveill Summ**, vol. 67, ed. 6, p. 1-23, 27 abr. 2018.

BAXTER, A.; BRUGHA, T.; ERSKINE, H.; SCHEURER, R.; VOS, T.; SCOTT, J. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. **Psychological Medicine**, Cambridge University, vol. 45, p. 601 – 613, 2015.

BAYAT, A. Science, medicine, and the future: Bioinformatics. **BMJ**, vol. 324, p. 1018 - 1022, 2002.

BEHRENS, M.; MEYERHOF, W. A role for taste receptors in (neuro)endocrinology? **Journal of Neuroendocrinology**, vol.31, p. 1 – 12, 2019.

BEHRENS, M.; MEYERHOF, W. G Protein – Coupled Taste Receptors. In: ZUFALL, F.; MUNGER, S. D. **Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli**. Elsevier, p. 227 – 244, 2016.

BEHRENS, M.; MEYERHOF, W. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. **Physiology & Behavior**, vol. 105, p. 4 – 13, 2011.

BENNETTO, L.; KUSCHNER, E. S.; HYMAN, S. L. Olfaction and Taste Processing in Autism. **Biological psychiatry**, vol. 62, n. 9, p. 1015-1021, 2007.

BIARNÉS, X.; MARCHIORI, A.; GIORGETTI, A. *et al*. Insights into the Binding of Phenylthiocarbamide (PTC) Agonist to its Target Human TAS2R38 Bitter Receptor. **Plos One**, vol. 5, n. 8, Agosto 2010.

BOGUSKI, M. S.; JONES, A. R. Neurogenomics: at the intersection of neurobiology and genome sciences. **Nature Neuroscience**, vol. 7, ed. 5, p. 429–433, 2004.

BOGUSKI, M.; JONES, A. Neurogenomics: at the intersection of neurobiology and genome sciences. ***Nat Neurosci***, vol. 7, p. 429 – 433, 2004.

BÖLTE, S.; GIRDLER, S.; MARSCHIK, P. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. **Cellular and Molecular Life Sciences**, vol. 76, p. 1275 – 1297, 2019.

BOURGERON, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. **Nature Neuroscience**, vol. 16, p. 551 – 563, Set. 2015.

BUCKLEY, A.; HOLMES, G. Epilepsy and Autism. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 6, 2016.

BURLEY, S. K.; BERMAN, H. M.; KLEYWEGT, G. J. *et al*.Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive. In: Alexander Wlodawer *et al*. (eds.), **Protein Crystallography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1607, p. 627 – 641, 2017.

CAILLÉ, I.; ALLINQUANT, B.; DUPONT, E. *et al*. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. **Development**, vol.131, n.9, p. 2173-2181, 2004.

CATTLEY, S.; ARTHUR, J. W. BioManager: the use of a bioinformatics web application as a teaching tool in undergraduate bioinformatics training, **Briefings in Bioinformatics**, vol. 8, n. 6, p. 457 – 465, 2007.

CHEN, P. C.; OLSON, E. M.; ZHOU, Q.; KRYUKOVA, Y.; SAMPSON, H. M.; THOMAS, D. Y.; SHYNG, S. L.; Carbamazepine as a novel small molecule corrector of trafficking-impaired ATP-sensitive potassium channels identified in congenital hyperinsulinism. **Journal of Biological Chemistry,** vol. 288, n. 29, p. 20942–20954, 2013.

CIGNARELLI, A.; GENCHI, V.A.; PERRINI, S.; NATALICCHIO, A.; LAVIOLA, L.; GIORGINO, F. Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. **Int. J. Mol. Sci.**, vol. 20, n. 759, 2019.

DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA. Discovery Studio Modeling Environment, versão 2017. San Diego, Dassault Systèmes, 2016.

DECKERS, C. L. P.; GENTON, P.; SILLS, G. J. SCHMIDT, D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. **Epilepsy Research**, vol. 53, p. 1 – 17, 2003.

DEMETRIUS, L. A.; MAGISTRETTI, P. J.; PELLERIN, L. Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. **Frontiers**, vol. 5, n. 522, 2015.

DEUTCH, A.; WINDER, D. A channel to neurodegeneration. **Nature Medicine**, vol. 12, n. 1, p. 17–8, 2006.

DEVARANENI, P. K.; MARTIN, G. M.; OLSON, E. M.; ZHOU, Q.; SHYNG, S. L.; Structurally distinct ligands rescue biogenesis defects of the KATP channel complex via a converging mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 290, p. 7980 – 7991, 2015.

DI PIZIO, A.; BEHRENS, M.; KRAUTWURST, D. Beyond the flavour: the potential druggability of chemosensory G Protein-Coupled Receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, p. 1 – 21, 2019.

DI PIZIO, A.; LEVIT, A.; SLUTZKI, M.; BEHRENS, M.; KARAMAN, R.; NIV, M. Comparing Class A GPCRs to bitter taste receptors: Structural motifs, ligand interactions and agonist-to-antagonist ratios. **Methods in Cell Biology**, vol. 132, p. 401 – 427, 2016.

DING, D.; WANG, M.; WU, J. *et al*. The Structural Basis for the Binding of Repaglinide to the Pancreatic K-ATP Channel. **Cell Reports**, vol. 27, p. 1848 - 1857, 2019.

DREWNOWSKI, A.; HENDERSON, S. A.; BARRATT-FORNELL, A. Genetic Taste Markers and Food Preferences. **Drug Metabolism and Disposition**, vol. 29, n. 4, p. 535-538, 2001.

DUKA, T.; NIKOLAOU, K.; KING, S. L. *et al*. GABRB1 Single Nucleotide Polymorphism Associated with Altered Brain Responses (but not Performance) during Measures of Impulsivity and Reward Sensitivity in Human Adolescents. **Front. Behav. Neuroscience**, vol. 11, n. 24, p. 11 – 24, 2017.

EKSTRAND, B.; YOUNG, J.; RASMUSSEN, M. Taste receptors in the gut – A new target for health promoting properties in diet. **Food Research International**, vol. 100, p. 1 – 8, 2017.

FISCHBACH, G.; LORD, C. The Simons Simplex Collection: A Resource for Identification of Autism Genetic Risk Factors. **Neuron**, vol. 68, p. 192 – 195, 2010.

GABIS, L. Autism spectrum disorder: A clinical path to early diagnosis, evaluation, and intervention. In: GOZES, I.; LEVINE, J. **Neuroprotection in Autism, Schizophrenia and Alzheimer's Disease**, Elsevier, p. 79 – 100, 2019.

GENE ONTOLOGY. The Gene Ontology Consortium, Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources, **Nucleic Acids Research**, vol. 45, p. 331 – 338, 2017.

GILBERT, J.; MAN, H. Fundamental elements in Autism: From neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, vol. 11, artigo 359, Nov. 2017.

HAEUSLER, R., MCGRAW, T. & ACCILI, D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, vol. 19**,** p. 31 – 44, 2018.

HAWRYLYCZ, M. J.; LEIN, E. S.; GUILLOZET-BONGAARTS, A. L. *et al*. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. **Nature**, vol. 489, p. 391–399, 2012.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes & Dev**, vol. 18, p. 1926 – 1945, 2004.

HOFFMANN, R. A wiki for the life sciences where authorship matters. **Nature Genetics**, vol. 40, n. 9, p. 1047 – 1051, 2008.

IGBENEGHU, C.; OLISEKODIAKA, J. M.; ONUEGBU, J. A.; OYEYODE, O. H. Phenylthiocarbamide Taste Perception among Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Asian Journal of Medicine and Health**, vol. 14, n. 4, p. 1 – 5, 2019.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. **J Chem Inf Model**, vol, 45, p. 177 – 182, 2005.

JAGGUPILLI, A.; HOWARD, R.; UPADHYAYA, J. D.; BHULLAR, R. P.; CHELIKANI, P. Bitter taste receptors: Novel insights into the biochemistry and pharmacology. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 77, p. 184 – 196, 2016.

JI, M.; SU, X.; CHEN, Y.; HUANG, W. *et al*. Identification of Novel Compounds for Human Bitter Taste Receptors. **Chem Biology Drug Des**, vol. 84, p. 63–74, 2014.

JOHANNESEN, K.; MARINI, C.; PFEFFER, S. *et al.* Phenotypic spectrum of *GABRA1*: From generalized epilepsies to severe epileptic encephalopathies**.** **Neurology**, vol. 87, n. 11, p. 1140-1151, 2016.

JUNEJA, M.; GUPTA, S.; THAKRAL, A. Prevalence of Unrecognized Autism Spectrum Disorders in Epilepsy: A Clinici-Based Study. **Journal of Pediatric Neurosciences**, vol. 13, p. 308 – 312, Jul – Set, 2018.

KHAZIPOV, R. GABAergic Synchronization in Epilepsy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol. 6, 2016.

KIM, J., GUAN, K. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. **Nat Cell Biol**, vol. 21, p. 63 – 71, 2019.

KINNAMON, S. S. G Protein – Coupled Taste Transduction. In: ZUFALL, F.; MUNGER, S. D. **Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli**. Elsevier, p. 271 – 285, 2016.

KITCHEN, D.B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 3, p. 935 – 949, 2004.

KRISHNAN, A.; ZHANG, R.; YAO, V.; THEESFELD, C. L. *et al*. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorders. **Nature Neuroscience**, vol. 19, p. 1454 – 1462, 2016.

LAFFITTE, A.; Neiers, F.; Briand, L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, vol. 17, p. 379 – 385, 2014.

LEE, R.; KOFONOW, J.; ROSEN, P.; SIEBERT, A.; CHEN, B.; DOGHRAMJI, L. *et al*. Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 124, n. 3, p. 1393 – 405, Mar 2014.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7th ed., Filadélfia, **Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer**, 2013.

LI, N.; WU, J.; DING, D. *et al*. Structure of a Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel. **Cell**, vol. 168, p. 101 – 110, 2017.

LIPTON, J. O.; SAHIN, M. Review: The Neurology of mTOR. **Neuron**, vol. 84, p. 275 – 291, 2014.

LOCHER, K. P. Review: Structure and mechanism of ATP-binding cassette transportes. **Phil. Trans. R. Soc. B**, vol. 364, p. 239 – 245, 2009.

LORD, C.; ELSABBAGH, M.; BAIRD, G.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Autism spectrum disorder. **Lancet**, vol. 392, p. 508 – 520, 2018.

MARTIN, G. M.; KANDASAMY, B.; DIMAIO, F. *et al*. Anti-diabetic drug binding site in a mammalian K-ATP channel revealed by Cryo-EM. **eLife**, 6:e31054, 2017b.

MARTIN, G. M.; YOSHIOKA, C.; REX, E. A. *et al*. Cryo-EM structure of the ATP-sensitive potassium channel illuminates mechanisms f assembly and gating. **eLife**, 6:e24149, 2017a.

MARTY, N.; DALLAPORTA, M.; THORENS, B. Brain Glucose Sensing, Counterregulation, and Energy Homeostasis. **Physiology**, vol. 22, p. 241–251, 2007.

MOBERG, P. J.; BALDERSTON, M. S.; RICK, J. H. et al. Phenylthiocarbamide (PTC) Perception in Parkinson Disease. **Cog Behav Neurol**, vol. 20, p. 145 – 148, 2007.

MUNGER, S. D. The Mechanisms of Salty and Sour Taste. In: ZUFALL, F.; MUNGER, S. D. **Chemosensory Transduction: The Detection of Odors, Tastes, and Other Chemostimuli**. Elsevier, p. 287 – 287, 2016.

NGUYEN, Q.; NICOLL, R. A. The $GABA_A$ Receptor β Subunit Is Required for Inhibitory Transmission. **Neuron**, vol. 98, p. 718 – 725, 2018.

NICHOLS, C. K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. **Nature**, vol. 440, p. 470 - 476, 2006.

OMS/WHO, World Health Oraganization. **Autism spectrum disorders**. World Health Oraganization. Publicação: 7 de Novembro de 2019. Disponível em: < https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>. Acesso em: 23 Jan 2020.

OPSAHL, T.; AGNEESSENS, F.; SKVORETZ, J. Node centrality in weighted networks: Generalizing degree and shortest paths. **Social Networks**, vol. 32, p. 245 – 251, 2010.

OVASKA, K., LAAKSO, M. & HAUTANIEMI, S. Fast Gene Ontology based clustering for microarray experiments. **BioData Mining**, vol. 1**,** n. 11, 2008.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophys Ver**, vol. 9, p. 91 – 102, 2017.

PAIN, O.; POCKLINGTON, A. J.; HOLMANS, P. A. *et al*. Novel insight into the etiology of Autism Spectrum Disorder gained by integrating expression data with Genome-wide Association Statistics. **Biological Psychiatry**, vol 86, p. 265 – 273, Agosto 2019.

PALMER, R. K. A Pharmacological Perspective on the Study of Taste. **Pharmacol Ver**, vol. 71, p. 20 – 48, jan 2019.

PUBCHEM. **Phenylthiourea**. PubChem, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/676454>. Acesso em: 12 Fev 2020.

RUBAIY, H. N. The therapeutic agents that target ATP-sensitive potassium channels. **Acta Pharm**, vol. 66, p. 23 – 34, 2016.

RUDOLPH, U.; KNOFLACH, F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. **Nat Rev Drug Discov**, vol. 10, n. 9, p. 685 – 697, 2011.

SANTOS, G.; BORGES, J. M. P.; AVILLA-RODRIGUEZ, M.; *et al*. Mitochondrial K_{ATP} Channel and Dopaminergic Vulnerability Neurons in Parkinson's Disease. In: PALERMO, S. **Parkinson's Disease and Beyond – A Neurocognitive Approach**. IntechOpen, 2019.

SANTOS, G.; GIRALDEZ-ALVAREZ, L. D.; ÁVILA-RODRIGUEZ, M. et al. SUR1 Receptor Interaction with Hesperidin and Linarin Predicts Possible Mechanisms of Action of *Valeriana officinalis* in Parkinson. **Frontiers**, vol. 8, n. 97, 2016.

SATO, A. mTOR, a Potential Target to Treat Autism Spectrum Disorder. **Grug Targets**, vol. 15, n. 5, p. 533 – 543, 2016.

SCHMIDT, DIETER. Drug treatment of epilepsy: Options and limitations. **Epilepsy & Behavior**, vol. 15, p. 56 – 65, 2009.

SCHRODINGER, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, 2010.

SEINO, S. Atp-Sensitive Potassium Channels: A Model of Heteromultimeric Potassium Channel/Receptor Assemblies. **Annu. Rev. Physiol**, vol. 61, p. 337–362, 1999.

SHEN, E. H.; OVERLY, C. C.; & JONES, A. R. The Allen Human Brain Atlas. **Trends in Neurosciences**, vol. 35, n. 12, p. 711 – 714, 2012.

SIEGHART, W.; FUCHS, K.; TRETTER, V. *et al*. Structure and subunit composition of GABAA receptors. **Neurochemistry International**, vol. 34, p. 379 – 385, 1999.

SIMEONE, X.; SIEBERT, D. C. B.; BAMPALI, K. *et al.* Molecular tools for $GABA_A$ receptors: High affinity ligands for β1-containing subtypes. **Sci Rep**, vol 7, n. 5674, 2017.

SPAGGIARI, G.; DI PIZIO, A.; COZZINI, P. Sweet, umami and bitter taste receptors: State of the art of *in sílico* molecular modeling approaches. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 96, p. 21 – 29, 2020.

SPENCE, S.; SCHNEIDER, M. The role of Epilepsy and Epileptiform EEGs in Autism Spectrum Disorders. **Pediatr Res**, vol. 65, n. 6, p. 599 – 606, Jun. 2009.

STALEY, K. Molecular mechanisms of epilepsy. **Nature Neuroscience**, vol. 18, n. 3, p. 367 – 372, Mar. 2015.

SUBRAMANIAN, A.; TAMAYO, P.; MOOTHA, V. et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **PNAS**, vol. 102, n. 43, p. 15545 – 15550, 2005.

SUN, H., FENG, Z. Neuroprotective role of ATP-sensitive potassium channels in cerebral ischemia. **Acta Pharmacol Sin**, vol. 34, p. 24–32, 2013.

SUNKIN, S. M.; NG, L.; LAU, C.; *et al*. Allen Brain Atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. **Nucleic Acids Research**, vol. 41, p. 996 – 1008, 2013.

TAN, J.; ABROL, R.; TRZASKOWSKI, B. *et al*. 3D Structure Prediction od TAS2R38 Bitter Receptors Bound to Agonists Phenylthiocarbamide (PTC) and 6-n-Propylthiouracil (PROP). **Journal of Chemical Information and Modeling**, vol. 52, p. 1875 – 1885, 2012.

THINAKARAN, G.; KOO, E. H. Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. **The Journal Of Biological Chemistry**, vol. 283, n. 44, p. 29615 – 29619, 2008.

TOLE, J. C.; BEHRENS, M.; MEYERHOF, W. Taste receptor function. **Handbook of Clinical Neurology**, vol. 164, n. 3, p. 173 – 185, 2019.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput. Chem**, vol. 31, p. 455 – 461, 2010.

TUCHMAN, R.; CUCCARO, M.; ALESSANDRI, M. Autism and epilepsy: Historical perspective. **Brain & Development**, vol. 32, p. 709 – 718, 2010.

UNDURTI, N. Das M. D. *et al*. Autism as a disorder of deficiency of brain-derived neurotrophic fator and altered metabolism of polyunsaturated fatty acids. **Nutrition**, vol. 29, p. 1175-1185, 2013.

VETROVOY, O.; RYBNIKOVA, E. A.; SAMOILOV, M. O. Cerebral Mechanisms of Hypoxic/Ischemic Postconditioning. **Biochemistry (Moscow)**, vol. 82, n. 3, p. 392 – 400, 2017.

WARWICK, S. I. Brassicaceae in Agriculture. **Genetics and Genomics of the Brassicaceae**, p. 33 – 65, 2010.

WEI, F.; YAN, L.; SU, T. *et al*. Ion channel genes and epilepsy: functional alteration, pathogenic potential, and mechanism of epilepsy. **Neurosci. Bull**, vol. 33, n. 3, p. 455 – 477, Agosto 2017.

WEINGARTEN, J.; WEINGARTEN, M.; WEGNER, M.; VOLKNANDT, W. APP - A Novel Player within the Presynaptic Active Zone Proteome. **Front. Mol. Neurosci**, vol. 10, n. 43, 2017.

WEIS, W. I.; KOBILKA, B. K. The Molecular Basis of G Protein - Coupled Receptor Activation. **Annual Review of Biochemistry**, vol. 87, p. 897 – 919, 2018**.**

YAMADA, K.; INAGAKI, N. ATP-Sensitive K^+ Channels in the Brain: Sensors of Hypoxic Conditions. **News Physiology Sci**, vol. 17, p. 127 – 130, 2002.