

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

DARLING DE ANDRADE LOURENÇO

**TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: UMA ANÁLISE POR BIOLOGIA
COMPUTACIONAL A PARTIR DAS MUTAÇÕES DAS VIAS PI3K/mTOR E β -
CATENINA/WNT E POSSÍVEL MODULAÇÃO POR RESVERATROL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2022

Darling de Andrade Lourenço

**TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: UMA ANÁLISE POR BIOLOGIA
COMPUTACIONAL A PARTIR DAS MUTAÇÕES DAS VIAS PI3K/mTOR E β -
CATENINA/WNT E POSSÍVEL MODULAÇÃO POR RESVERATROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Mellanie Fontes Dutra da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Lourenço, Darling de Andrade
Transtorno do Espectro Autista: uma análise por
biologia computacional a partir das mutações das vias
PI3K/mTOR e β -catenina/Wnt e possível modulação por
resveratrol / Darling de Andrade Lourenço. -- 2022.
115 f.
Orientadora: Mellanie Fontes Dutra.

Coorientador: Geancarlo Zanatta.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Vias do
neurodesenvolvimento. 3. Biologia computacional. 4.
Resveratrol. I. Fontes Dutra, Mellanie, orient. II.
Zanatta, Geancarlo, coorient. III. Título.

Darling de Andrade Lourenço

**TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: UMA ANÁLISE POR BIOLOGIA
COMPUTACIONAL A PARTIR DAS MUTAÇÕES DAS VIAS PI3K/mTOR E β -
CATENINA/WNT E POSSÍVEL MODULAÇÃO POR RESVERATROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em
Bioquímica.

Aprovado em: 19 de Outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carmem Gottfried – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Bruno da Rocha – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica,
Universidade Federal do Ceará

Dra. Angela Casaril – Department of Symptom Research, The University of Texas MD
Anderson Cancer Center

**Pelo apoio incondicional, dedico este trabalho à
minha mãe, Nara.**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por todo amor e suporte incondicionais e por todos os sacrifícios em prol dos meus sonhos. Agradeço por toda tua força e determinação, e por ser um grande modelo de vida. Também agradeço a todo meu núcleo familiar pelo incentivo durante essa jornada.

Agradeço à Mellanie, minha orientadora, por todos os ensinamentos, apoio, carinho e por tornar esse período mais fluído e leve, mesmo em meio ao caos. Obrigada por também ser um grande exemplo e modelo na divulgação científica! Agradeço ao Geancarlo, meu coorientador, por ter aceitado o convite de me coorientar e por todo o conhecimento que foi transmitido ao longo desse período. Sem tua ajuda e ensinamentos, esse trabalho não teria sido possível. Agradeço imensamente à professora Carmem, por ter me acolhido no grupo de pesquisa e me apresentado à Mellanie e ao Geancarlo e, acima de tudo, por ter sido uma grande mentora durante os períodos conturbados no início da pandemia.

Agradeço a todos os colegas do Grupo de Pesquisa em Plasticidade Neuroglial, pelos grandes exemplos de pesquisadores. Agradeço aos demais colaboradores desse trabalho, principalmente a Fernanda, que tornou possível uma parte importante e tornou as etapas finais mais leves. Sou grata aos membros da banca por terem aceitado o convite e contribuírem para a construção desse trabalho, reforçando que a ciência é colaborativa.

Agradeço ao PPG Bioquímica e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade e apoio ao desenvolver este trabalho. Também agradeço aos técnicos administrativos Giordano e Cléia, do Departamento de Bioquímica, por toda ajuda. Com certeza, me proporcionaram maior paz interior em momentos de desespero com informações. Agradeço aos professores com quem tive disciplinas, principalmente ao prof. André, por ter sido uma grande inspiração. Sou imensamente grata ao Centro Nacional de Supercomputação (CESUP), da UFRGS, e ao Sistema Nacional de Processamento de Alto Desempenho (SINAPAD), que proporcionaram as condições para todas as simulações deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos e amigas, com destaque para o Dionatan, a Margarida e a Gabriela, por toda paciência e compreensão nos meus momentos de ausência. Agradeço à Renata, amiga que o mestrado me proporcionou e que tornou as disciplinas e o período de mestrado mais leve. Agradeço a quem me apoia em todas as minhas decisões e torce junto para que realize meus sonhos. Sou grata por tornar meus dias mais leves e tornar meu coração mais quente. Também agradeço a todos meu companheiros e companheiras de jornada, principalmente de carreira acadêmica, que de alguma forma me acolheram e deixaram suas marcas em mim.

Por fim, agradeço às agências de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FAPERGS, por todo apoio financeiro, pela resistência frente aos constantes cortes, pela luta contra o negacionismo científico. Sigamos firmes e fortes lutando a favor da educação e da ciência. O futuro desse país depende de nós.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza.”

Marie Curie

“A história de toda sociedade até nossos dias é a história das lutas de classes.”

Karl Marx

PARTE I

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um grupo de desordens complexas e heterogêneas do neurodesenvolvimento, caracterizadas pela tríade comportamental de déficits na comunicação e interação social e pela presença de comportamentos restritos e/ou repetitivos. Apesar da etiologia do TEA permanecer pouco elucidada, sabe-se que existe uma interação entre fatores genéticos e ambientais. Duas das principais vias do neurodesenvolvimento são as vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR e Wnt/ β -catenina, ambas essenciais para processos de proliferação, diferenciação e migração celular. Apesar de mutações com troca de aminoácido em proteínas chave dessas vias serem observadas no desenvolvimento do TEA, pouco se sabe sobre seu efeito estrutural a nível protéico. O resveratrol (RSV), um polifenol presente em uvas e amendoins, vem sendo utilizado como ferramenta intraútero para o estudo do TEA no modelo animal de autismo induzido por ácido valproico (VPA). Além disso, estudos mostram que o RSV exerce efeitos direta e indiretamente sobre as vias da PI3K/Akt/mTOR e Wnt/ β -catenina. Com isso em vista, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de algumas mutações envolvidas no TEA na estrutura de proteínas das vias mencionadas e investigar a interação entre o RSV e as proteínas através de abordagens *in silico*. O banco de dados SFARI Gene database foi utilizado para pesquisar por mutações nas proteínas da família PI3Ks de classe I, mTOR e β -catenina. Os critérios de inclusão utilizados foram (i) o nível de associação com TEA, (ii) estar presente ou próximo do sítio catalítico das enzimas. Foram selecionadas as mutações G914R e A1035T da p110 α , as mutações G373R e V398I da p85 β , as mutações S2215Y, S2215F e F2202C da mTOR e as mutações R376H, W504X, S425X, R515X, Q309X, V349AX, Y333X, R474X, G268NX, e S348CX de β -catenina. As estruturas tridimensionais, tanto das formas selvagem (WT) quanto das respectivas variantes, foram modeladas por homologia e submetidas à simulação de dinâmica molecular (DM) para equilibrar os modelos e obter conjuntos de distintos estados conformacionais. Em seguida, a interação entre o *trans*-RSV e cada um dos estados conformacionais foi simulada e os melhores resultados foram submetidas a uma nova DM de 100ns para equilibrar/estabilizar os sistemas. As trajetórias resultantes foram analisadas através das medidas de raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD), raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF), energia livre de ligação e contribuição individual de cada aminoácido para a interação com o RSV. Os resultados obtidos indicaram que nove mutações de β -catenina implicam em perda de função das proteínas e redução da atividade da via enquanto que mutação R376H acrescenta certa rigidez à estrutura. O RSV apresenta maior afinidade de ligação com a mutação G914R de p110 α , com a qual forma um complexo mais estável do que o formado com a forma WT. As mutações de p85 β geraram resultados conflitantes, mas o RSV apresentou maior afinidade de ligação com as mutações do que com a WT. Em relação à mTOR, o RSV apresentou maior afinidade de ligação e um complexo mais estável com a mutante F2202C, enquanto que as mutações S2215Y e S2215F demonstraram um comportamento anormal. Os dados evidenciaram que o RSV apresenta maior afinidade de ligação com os sítios catalíticos de proteínas contendo mutações associadas ao TEA do que com suas formas WT, indicando promissora atividade no contexto do TEA.

Palavras-chave: transtorno do espectro autista, resveratrol, vias do neurodesenvolvimento, PI3K, mTOR, β -catenina.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a group of complex and heterogeneous neurodevelopmental disorders, characterized by the behavioral dyad of communication and social interaction deficits and the presence of restricted and/or repetitive behaviors. The etiology of ASD remains poorly understood, despite evidence of an interaction between genetic and environmental factors. Two of the main signaling pathways involved in developmental processes are PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin, both essential for cell proliferation, differentiation, and migration. Although amino acid exchange mutations in key proteins of these pathways are observed in the development of ASD, little is known about their structural effect at the protein level. Resveratrol (RSV), a polyphenol present in grapes and peanuts, has been used as an intrauterine tool for the study of ASD in an animal model of autism induced by valproic acid (VPA). Furthermore, studies show that RSV exerts effects directly and indirectly on the PI3K/Akt/mTOR and Wnt/ β -catenin pathways. In line with this, the aim of the study was to analyze the effect of some mutations ASD-related on the structure of proteins of the mentioned pathways and to investigate the interaction between RSV and these proteins through *in silico* approaches. The SFARI Gene database was used to search for mutations in the class I PI3Ks family proteins, mTOR, and β -catenin. The inclusion criteria used were (i) the level of association with ASD, and (ii) being present at or close to the catalytic site of the enzymes. The p110 α mutations G914R and A1035T, p85 β mutations G373R and V398I, mTOR mutations S2215Y, S2215F and F2202C, and β -catenin mutations R376H, W504X, S425X, R515X, Q309X, V349AX, Y333X, R474X, G268NX, and S268NX, were selected. The three-dimensional structures of both wild-type (WT) and respective variants were modeled by homology modeling and submitted to molecular dynamics (MD) simulation to balance the models and obtain sets of different conformational states. Then, the interaction between the trans-RSV and each of the conformational states of enzymes was simulated and the best results were submitted to a new MD of 100ns to balance/stabilize the systems. The resulting trajectories were analyzed through measurements of root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF), binding free energy, and individual contribution of each amino acid to the interaction with RSV. The results obtained indicated that nine β -catenin mutations imply a loss of protein function and a reduction in the activity of the pathway, while the R376H mutation adds certain rigidity to the structure. RSV has a higher binding affinity with the G914R mutation of p110 α , with which it forms a more stable complex than that formed with the WT form. The p85 β mutations generated conflicting results, but RSV showed a higher binding affinity with the mutations than with WT. In relation to mTOR, RSV showed a higher binding affinity with the F2202C mutant, while the S2215Y and S2215F mutations showed an abnormal behavior. The data showed that RSV has a higher binding affinity with the catalytic sites of proteins containing mutations associated with ASD than with its WT forms, indicating promising activity in the context of ASD.

Keywords: autism spectrum disorder, resveratrol, molecular dynamics, neurodevelopmental pathways, PI3K, mTOR, β -catenin.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Vias de sinalização envolvidas na ativação de mTORC1.. | 12 |
| Figura 2. Representação da via de sinalização canônica da Wnt/ β -catenina ativa e inativa..... | 14 |
| Figura 3. Estrutura do trans-resveratrol. Fonte: PubChem (ID: 445154)..... | 17 |

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBPs – Proteínas de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4

Akt – Proteína cinase B

AMPK – Cinase ativada por adenosina monofosfato

ATP – adenosina trifosfato

BCL9 – Proteína de linfoma 9 de células B

DEPTOR – Proteína de interação com mTOR contendo domínio DEP

DM – Dinâmica molecular

Dvl – Proteína Dishevelled

ERK 1/2 – Cinases reguladas por sinal extracelular

FKBP12 – Proteína 12-kDa FK506-binding protein

FZD – Receptores *frizzled*

GSK3 – Glicogênio sintase cinase 3

HDACs – Histonas desacetilases

MIA – Ativação imune materna

mLST8 – Subunidade LST8 do complexo mTOR

MM/PBSA – Mecânica Molecular/Área de Superfície de Poisson-Boltzmann

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

mTOR – Alvo mamífero da rapamicina

PDK 1/2 – proteína cinase 1 e 2 dependente de fosfoinosítideo

PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase

PIP2 – Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PIP3 – Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PRAS40 – Substrato Akt rico em prolina de 40 kDa

PTEN – Proteína fosfatase homóloga à tensina

RAPTOR – Proteína associada à regulação de mTOR

RMSD – Raiz quadrada do desvio quadrático médio

RMSF – Raiz quadrada da flutuação quadrática média

RSV – Resveratrol

S6Ks – Proteínas cinases ribossômica S6

SIRT1 – Sirtuína 1

SNC – Sistema nervoso central

SNPs – Polimorfismos de nucleotídeo único

SNV – Variante de nucleotídeo único

TCF/LEF – Fator de células T/fator potenciador linfóide

TEA – Transtorno do Espectro Autista

TKR – Receptores tirosina-cinase

TSC 1/2 – Proteínas 1 e 2 da esclerose tuberosa

VPA – Ácido valproico

Wnt – *Wingless*

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| PARTE I..... | 1 |
| RESUMO..... | 2 |
| ABSTRACT..... | 3 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 4 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 5 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 1.1. Transtorno do Espectro Autista (TEA) | 8 |
| 1.2. Vias de sinalização envolvidas no neurodesenvolvimento | 9 |
| 1.3. PI3K/Akt/mTOR e sua atuação no contexto do TEA..... | 9 |
| 1.4. Wnt/ β -catenina no contexto do TEA..... | 13 |
| 1.5. Modelo VPA e sua associação com as vias analisadas | 15 |
| 1.5.1. O resveratrol como ferramenta intraútero para estudo no TEA | 16 |
| 1.6. Biologia computacional..... | 18 |
| 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE | 20 |
| 3. OBJETIVOS | 20 |
| 3.1. Objetivo geral | 20 |
| 3.2. Objetivos específicos | 21 |
| PARTE II | 22 |
| Capítulo I..... | 23 |
| PARTE III | 78 |
| 4. DISCUSSÃO | 79 |
| 5. CONCLUSÃO | 86 |
| 6. PERSPECTIVAS..... | 86 |
| REFERÊNCIAS..... | 87 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) se refere a um grupo complexo e heterogêneo de desordens do neurodesenvolvimento caracterizadas pela tríade comportamental de déficits na comunicação e interação social e pela presença de padrões de comportamentos restritos e/ou repetitivos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Os dados epidemiológicos do TEA variam de acordo com a população, mas indicam que a prevalência mundial em homens é quatro vezes maior do que em mulheres e a estimativa é de que 1 a cada 160 crianças possuam diagnóstico para TEA no mundo (LORD *et al.*, 2020; ZEIDAN *et al.*, 2022). Nos Estados Unidos, a prevalência do transtorno é cerca de 1:44 crianças com 8 anos de idade (MAENNER *et al.*, 2021).

Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia do TEA, a sua etiologia permanece pouco elucidada. Todavia, os estudos indicam que esse transtorno é heterogêneo e multifatorial, com fatores genéticos e ambientais de risco podendo estar presentes, consolidando o espectro que caracteriza o TEA. Quanto ao componente genético, estima-se que a concordância e herdabilidade para o TEA entre gêmeos monozigóticos possam alcançar valores no patamar de 90% (ROSENBERG *et al.*, 2009; SANDIN *et al.*, 2017). Em estudos de perfil fenotípico utilizando gêmeos monozigóticos e dizigóticos, foi possível observar que as características do TEA são muito mais severas em gêmeos monozigóticos do que em gêmeos dizigóticos (HU; DEVLIN; DEBSKI, 2019; ROSENBERG *et al.*, 2009). No geral, sabe-se que existe uma relevância do componente genético para desordem, mas que por si só não explica a boa parte dos casos, demonstrando a importância de compreender os fatores ambientais envolvidos na desordem. Além disso, fatores ambientais como ativação imune materna (MIA), idade avançada materna (>40 anos) e paterna (>50 anos) e exposição pré-natal à fármacos teratogênicos como o ácido valpróico (VPA), apresentam correlação estabelecida com o risco para desenvolvimento do TEA na vida pós-natal (GOTTFRIED *et al.*, 2015; LORD *et al.*, 2020).

1.2. Vias de sinalização envolvidas no neurodesenvolvimento

O neurodesenvolvimento durante o período pré-natal compreende um processo complexo e rigorosamente orquestrado por diversas vias de sinalização molecular, as quais também apresentam grande relevância na vida pós-natal. Dentre as vias envolvidas, as que mais se destacam são a cascata fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), proteína cinase B (Akt), alvo mamífero da rapamicina (mTOR) e a via *Wingless* (Wnt)/ β -catenina (UPADHYAY *et al.*, 2021; WANG, *et al.*, 2017). A importância da via da mTOR e da via da Wnt/ β -catenina durante o neurodesenvolvimento, bem como desregulações nessas vias sinalizadoras são evidenciadas através dos diversos estudos relacionando alterações nessas vias com desordens do neurodesenvolvimento, como o TEA, epilepsia, déficit intelectual, microcefalia e macrocefalia (LEVITT; VEENSTRA-VANDERWEELE, 2015; LICAUSI; HARTMAN, 2018; WANG, *et al.*, 2017).

1.3. PI3K/Akt/mTOR e sua atuação no contexto do TEA

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é presente constitutivamente e desempenha importantes funções na regulação da transdução de sinais e processos biológicos em todos os períodos do desenvolvimento e crescimento dos mamíferos. Entre os processos que essa via regula, encontram-se a proliferação, diferenciação e migração celular, apoptose e regulação da homeostase (XU, F. *et al.*, 2020). Especificamente no microambiente cerebral, essa via de sinalização está envolvida, principalmente, nos processos de sinaptogênese, corticogênese e plasticidade sináptica (GILBERT; MAN, 2017). Diversas patologias são associadas tanto com a hipotativação, quanto com a hiperativação desta via, como doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (CHONG *et al.*, 2012; TRAMUTOLA *et al.*, 2015; WANG, Long *et al.*, 2017), além de diversos tipos de câncer (IKSEN; POTHONGSRISIT; PONGRAKHANANON, 2021; TARANTELLI *et al.*, 2020).

A cascata de sinalização da PI3K/Akt/mTOR é dividida em duas partes: o recrutamento e translocação da PI3K e a posterior sinalização *downstream* através da Akt. A família de PI3K é subdividida em três subtipos de acordo com suas estruturas e especificidade de substratos (classes I, II e III). A classe I se subdivide em IA e IB, baseado no modo de ativação. As enzimas da classe I de PI3K são compostas por uma subunidade regulatória (p85 α e p85 β) e por uma subunidade catalítica (p110 α , p110 β ,

p110 δ e p110 γ). A classe I é a mais estudada no contexto da neurociência, uma vez que desregulações específicas das subunidades catalíticas, tanto em células neurais quanto em não-neurais, estão envolvidas em diversas desordens mentais (ENRIQUEZ-BARRETO; MORALES, 2016), como Doença de Alzheimer e epilepsia (GROSS; BASSELL, 2014), esquizofrenia e o TEA (CHEN; ALBERTS; LI, 2014).

Brevemente, o estímulo para a ativação desta via de sinalização tem início com a ativação dos receptores tirosina-cinase (TKR, *tyrosine kinases receptor*) e receptores de citocinas, que após fosforilados, atuam como sítios âncoras para a subunidade regulatória p85 da PI3K. Essa ligação resulta na ativação da subunidade catalítica p110 que converte o substrato fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que atua como segundo mensageiro em diversas outras vias de sinalização (XU, F. *et al.*, 2020). Uma vez formado, o PIP3 irá recrutar para a membrana celular outras proteínas da sequência *downstream* da via, como a Akt, responsável por fosforilar e ativar o resíduo Thr308 da proteína cinase 1 dependente de fosfoinosítideo (PDK1), além de também fosforilar a PDK2. Essa sequência molecular culmina com a ativação da mTORC1. (JEAN; KIGER, 2014; XU, F. *et al.*, 2020). Através de seus efetores *downstream*, a mTORC1 regula processos celulares importantes, como a tradução de mRNAs, síntese de nucleotídeos e lipídeos, metabolismo da glicose, autofagia e síntese dos complexos de proteicos envolvidos na degradação de proteínas (SAXTON; SABATINI, 2017).

A mTOR é uma proteína cinase serina/treonina que dá origem à dois complexos funcionais e distintos conhecidos como mTOR complexo 1 (mTORC1) e mTOR complexo 2 (mTORC2) (SAXTON; SABATINI, 2017). Ambos os complexos regulam inúmeros processos celulares centrais para o metabolismo, como para a síntese de proteínas, lipídeos e nucleotídeos no caso do mTORC1 e integridade do citoesqueleto e migração celular, no caso do mTORC2 (OH; JACINTO, 2011; SABATINI, 2017). Além disso, o mTORC1 é sensível ao composto rapamicina, uma lactona macrocíclica produzida por *Streptomyces hygroscopicus* com função antifúngica (SELVARANI; MOHAMMED; RICHARDSON, 2021) e que, ao formar um complexo com a proteína 12-*kDa FK506-binding protein* (FKBP12), age especificamente como um inibidor alostérico do mTORC1 (LI, J.; KIM; BLENIS, 2014) enquanto que o mTORC2 é insensível à rapamicina (KIM, J.; GUAN, 2019). Apesar do número de estudos envolvendo o complexo mTORC2 ser crescente, o mTORC1 e a sua sinalização é o complexo que

está predominantemente envolvido em desordens neurológicas (CRINO, 2016). O complexo mTORC1 é formado pela união das subunidades mTOR, proteína de interação com mTOR contendo domínio DEP (DEPTOR), proteína associada à regulação de mTOR (RAPTOR), subunidade LST8 do complexo mTOR (mLST8) e substrato Akt rico em prolina de 40 kDa (PRAS40).

O mTORC1 pode ser ativada por três vias distintas, são elas: a via de sinalização das cinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1/2, a via da proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e a via de sinalização PI3K-Akt. A última é uma das mais importantes vias de sinalização para ativação do mTORC1 e sua desregulação está envolvida em inúmeras doenças, como câncer (PAPLOMATA; O'REGAN, 2014), desordens neurodegenerativas (XU, F. *et al.*, 2020) e neuropsiquiátricas (SHARMA; MEHAN, 2021). Uma proteína importante na regulação da atividade de ambos complexos da mTOR é a glicogênio sintase cinase 3 beta (GSK3 β). Os dados da literatura são controversos e ainda não completamente elucidados, com alguns trabalhos demonstrando que a GSK3 β leva tanto à inativação da mTORC1/2 quanto à ativação dessa via. Apesar dos dados conflitantes, as evidências indicam que ambas GSK3 β e mTORC1 estão conectadas e que se regulam mutuamente através de vias não muito bem esclarecidas (EVANGELISTI *et al.*, 2020; STUMP *et al.*, 2019). Uma das principais funções atribuídas ao mTORC1 é a de proliferação celular através da regulação da tradução de RNA mensageiro (mRNA) por meio da fosforilação dos seus alvos, como as proteínas de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica 4 (4EBPs) e proteínas cinases ribossômica S6 (S6Ks). Além disso, o mTORC1 também está envolvido na síntese de pirimidinas, purinas e de lipídeos (FIGLIA; GERBER; SUTER, 2018).

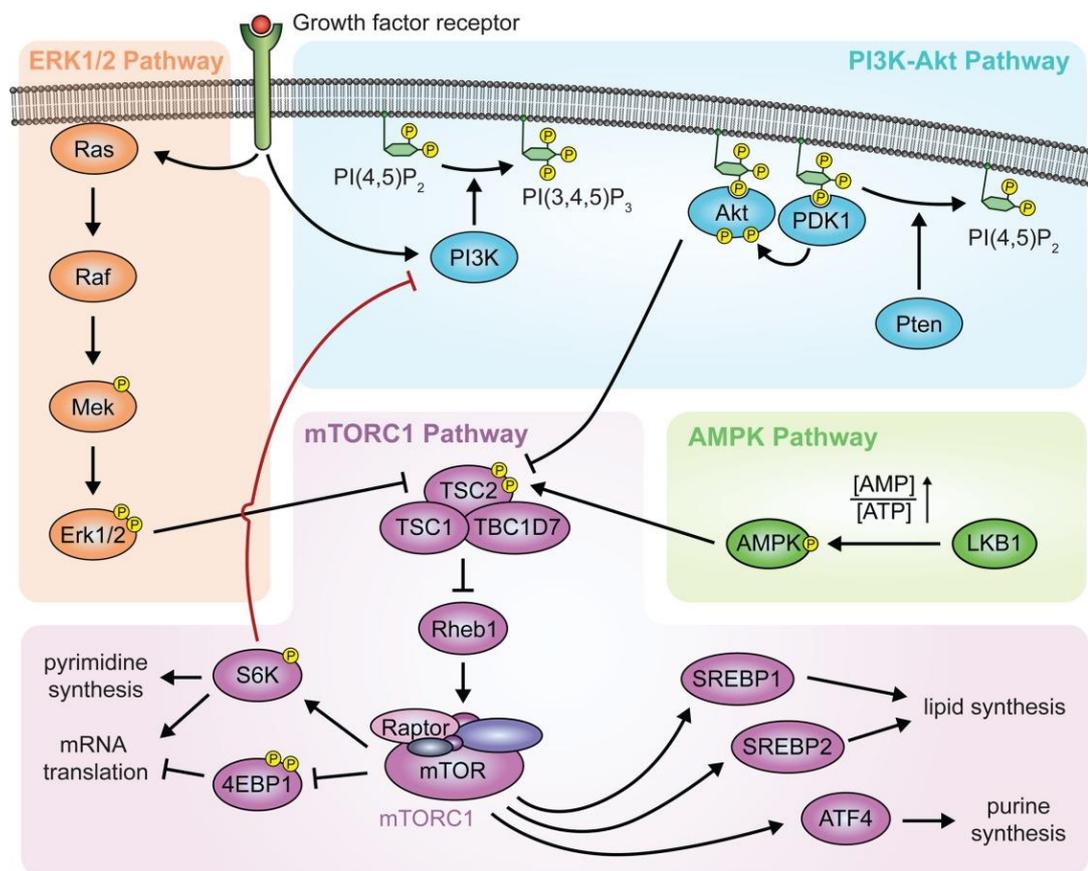


Figura 1. Vias de sinalização envolvidas na ativação de mTORC1. Na ativação do mTORC1 pela via PI3K-Akt, um estímulo externo por fatores de crescimento leva a ativação dos TKRs de membrana celular para converter PIP2 a PIP3, o segundo mensageiro que sinaliza para o recrutamento da Akt, que se torna ativa com essa interação. A ativação de Akt inibe o TSC, que torna a Rheb1 ativa e, conseqüentemente, o mTORC1 se torna ativo para desempenhar suas funções, como a síntese de proteínas, regulação do metabolismo e crescimento celular via modulação de S6K1 e 4EBP1. Fonte: FIGLIA, GERBER e SUTER, 2018.

No contexto do TEA, a hiperativação da via PI3K/Akt/mTOR, causada pela inativação da proteína fosfatase homóloga à tensina (PTEN), a qual exerce efeito regulatório negativo sobre a via, está associada com características fisiopatológicas do transtorno, como desregulação axonal, macrocefalia e alterações na circuitaria neuronal (HUTSLER; ZHANG, 2010; SUBRAMANIAN *et al.*, 2015). Essa hiperativação também exerce efeitos negativos em comorbidades do TEA, como a depressão, através do desequilíbrio na transmissão serotoninérgica; aumento das espécies reativas de oxigênio, associado à disfunção mitocondrial; apoptose neuronal e neuroinflamação. Esses efeitos são revertidos através da ação neuroprotetora apresentada pela administração de inibidores da PI3K e da mTOR em ensaios clínicos com pacientes e testes em modelos animais utilizando roedores (revisado em SHARMA; MEHAN, 2021). Algumas das alterações encontradas na via PI3K/Akt/mTOR são resultantes de mutações genéticas em genes diretamente ligados à cascata, bem como em outros

genes que exercem funções indiretas sob essa via. Mutações em genes de proteínas que exercem regulação na cascata PI3K/mTOR, como PTN, TSC1, TSC2 e PI3K, recentemente foram identificados como fatores de risco para o desenvolvimento de TEA (WINDEN; EBRAHIMI-FAKHARI; SAHIN, 2018). Ademais, mutações que resultam em troca de aminoácidos diretamente nas sequências de PI3K e mTOR também apresentam alta confiabilidade como um fator de risco para o transtorno (IOSSIFOV *et al.*, 2014; MIRZAA *et al.*, 2016; REIJNDERS *et al.*, 2017; YEUNG *et al.*, 2017)

1.4. Wnt/ β -catenina no contexto do TEA

A sinalização da família Wnt é fundamental para o neurodesenvolvimento embrionário e para coordenação de processos pós-neurodesenvolvimento, como proliferação celular, determinação da polaridade celular, regionalização do sistema nervoso central (SNC), diferenciação de progenitores neurais, migração neuronal, desenvolvimento de dendritos e orientação axonal, bem como sinaptogênese, neurogênese e plasticidade neural (MCLEOD; SALINAS, 2018). Devido à importância dessa via, qualquer perturbação dessa sinalização pode desencadear desordens relacionadas à estrutura ou às funções do SNC (KUMAR *et al.*, 2019).

A Wnt possui três diferentes vias de ativação, entre essas, encontra-se a chamada via canônica de ativação, a qual depende da proteína co-ativadora de transcrição β -catenina (MACDONALD; TAMAI; HE, 2009). A β -catenina é uma proteína endógena que é codificada pelo gene *CTNNB1*, um componente de junção aderente ligado à E-caderina. A sinalização através da via canônica tem início com a ligação da Wnt aos receptores *frizzled* (FZD), os quais inibem o complexo de destruição da β -catenina, translocando-a do citoplasma ao núcleo (LIU, J. *et al.*, 2022). Uma das proteínas que compõe esse complexo de destruição é a GSK3 β . Quando não há a ligação da Wnt aos receptores FZD, a GSK3 β fosforila a β -catenina, o que leva à destruição da mesma e inativação da via Wnt/ β -catenina (HUANG *et al.*, 2017; WU; PAN, 2010).

Uma vez no núcleo, a β -catenina desaloja o repressor Groucho e recruta vários cofatores da proteína de linfoma 9 de células B (BCL9) através da sua ligação com os fatores de transcrição da família fator de células T/fator potenciador linfóide (TCF/LEF),

o que permite a transcrição de genes alvos que estão envolvidos na diferenciação, proliferação e adesão celular (UPADHYAY *et al.*, 2021).

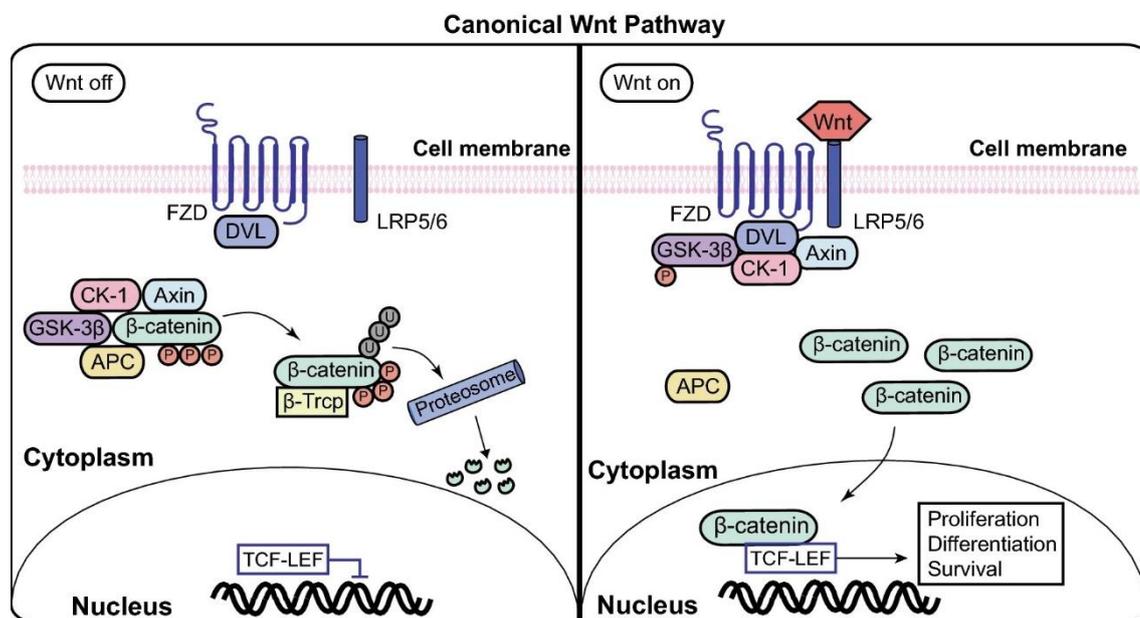


Figura 2. Representação da via de sinalização canônica da Wnt/β-catenina ativa e inativa. Na ausência da proteína Wnt, a β-catenina se liga ao complexo de destruição formado pelas proteínas APC, axina, CK1 e GSK3β, resultando na fosforilação da β-catenina, sua ubiquitinação e consequente degradação através do proteossomo, inibindo sua entrada no núcleo. Na presença de Wnt, o receptor FZD é ativado, resultando na fosforilação de GSK3β. Isso inibe a formação do complexo de degradação, liberando a β-catenina para se acumular no citoplasma e translocar ao núcleo, onde se associa ao complexo TCF/LEF, alterando a transcrição gênica relacionada à proliferação, diferenciação e sobrevivência. Fonte: EL SABEH *et al.*, 2021.

Devido à importância dessa via no desenvolvimento embrionário e no neurodesenvolvimento, a via da Wnt/β-catenina tem sido implicada diretamente na etiologia e fisiopatologia do TEA (KWAN; UNDA; SINGH, 2016). Nos últimos anos, estudos com sequenciamento de genoma demonstraram a presença de microdeleções, microduplicações e a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes convergentes dessa via, tanto em pacientes com TEA, quanto em modelo animal para autismo utilizando roedores (BAE; HONG, 2018). Mutações que resultam em trocas de aminoácidos foram identificadas e associadas com a hiperativação da via canônica Wnt/β-catenina enquanto que mutações *nonsense*, que resultam em proteínas estruturalmente defeituosas, estão associadas com a perda de função da via (CARACCI *et al.*, 2021).

1.5. Modelo VPA e sua associação com as vias analisadas

O modelo animal de TEA em roedores, o qual pode ser induzido por administração pré-natal do ácido valpróico (VPA), um fármaco com ação antiepiléptica, é utilizado para o estudo das bases etiológicas e fisiopatológicas desse transtorno (CHRISTIANSON; CHESTER; KROMBERG, 1994; RODIER *et al.*, 1997; SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005). Estudos evidenciam que o modelo VPA é robusto e reproduz, principalmente machos da prole, alterações comportamentais relacionadas com a díade comportamental do TEA, como déficits na interação social e comportamentos estereotipados, com validade de face e constructo, além de outras alterações (BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2011; CHALIHA *et al.*, 2020; SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005).

Embora os mecanismos moleculares da ação do VPA na indução das alterações vistas no modelo de TEA ainda não sejam completamente elucidadas, algumas vias podem estar relacionadas com esse contexto etiológico e fisiopatológico. A principal hipótese postulada para o mecanismo de ação do VPA é a partir do seu efeito inibidor de histonas desacetilases (HDACs) das classes I e II, que são expressas no encéfalo, durante uma janela crítica do desenvolvimento embrionário cerebral (NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018). Além disso, o VPA também modula a atividade da glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), que culmina com a hiperativação da Wnt/ β -catenina, uma vez que a GSK3 faz parte do sistema modulador da atividade da β -catenina (UPADHYAY *et al.*, 2021).

Ademais, a exposição pré-natal ao VPA também está associada com desequilíbrio excitatório/inibitório, alterações nos sistemas de neurotransmissores e estresse oxidativo e neuroinflamação (TARTAGLIONE *et al.*, 2019). Ainda, a administração gestacional de VPA também induz a ativação sequencial e anormal das vias Wnt/ β -catenina e PI3K/Akt/mTOR, culminando com a ruptura da última, afetando principalmente a sinalização *downstream* através do efector p70S6K. Essa hipótese é confirmada através dos resultados em animais do modelo VPA utilizando administrações individuais de rapamicina, um inibidor da via da mTOR com ação em mTORC1. Essa administração dos inibidores teve um efeito positivo sobre os comportamentos sociais e outras características do tipo autista dos animais pré-natalmente expostos ao VPA (NICOLINI *et al.*, 2015; QIN; DAI; YIN, 2016). No que diz respeito a via Wnt/ β -catenina, evidências indicam que a administração de VPA no modelo de autismo utilizando

roedores, aumenta a ativação da sinalização de forma direta ou indireta, através de mecanismos ainda pouco elucidados (JUNG *et al.*, 2008; QIN; DAI; YIN, 2016). Um dos mecanismos envolvidos nesse aumento da atividade da via é a inibição da atividade da GSK3 β pelo VPA, porém também se sabe que a administração de sulindaco, um inibidor da via canônica da Wnt/ β -catenina, a partir do bloqueio do domínio PDZ da proteína Dishevelled (Dvl), reverte os comportamentos sociais tipo-autistas induzidos pela administração de VPA (KUMAR *et al.*, 2019; QIN; DAI, 2015).

1.5.1. O resveratrol como ferramenta intraútero para estudo no TEA

O resveratrol (RSV) (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) é um composto polifenólico da família dos estilbenos encontrado em algumas espécies de plantas, como uvas e seus derivados, amendoim e frutas vermelhas (NATH *et al.*, 2022). O RSV pode ser encontrado nas formas isoméricas *cis* e *trans*, todavia, o *trans*-RSV é mais abundante e também apresenta maior atividade biológica (ROBERTSON *et al.*, 2022). Assim como diversos compostos polifenólicos, o RSV possui uma potente atividade biológica e propriedades medicinais que vêm sendo exploradas nas últimas décadas, como a capacidade antioxidante, anti-inflamatória, efeitos antifúngicos e antivirais, bem como neuroproteção, cardioproteção, efeitos positivos sobre o envelhecimento e sobre células cancerígenas (ABU-AMERO; KONDKAR; CHALAM, 2016; GOTTFRIED, C; QUINCOZES-SANTOS; BASLI, 2011; LIMMONGKON *et al.*, 2017; NATH *et al.*, 2022; RAUF *et al.*, 2017; VANG *et al.*, 2011).

Em relação aos seus efeitos no SNC, diversos estudos demonstraram efeitos neuroprotetores do RSV em modelos animais para a doença de Alzheimer (MA *et al.*, 2020) e em ensaios clínicos randomizados (GU *et al.*, 2021). Ademais, um ensaio clínico utilizando pacientes com esquizofrenia demonstrou que o RSV como terapia adjunta melhora os sintomas negativos dessa desordem, que incluem a perda de diversas funções cognitivas, como expressões emocionais e comunicação social e verbal (SAMAEI *et al.*, 2020). Muitos desses efeitos do RSV estão associados ao seu mecanismo de ação através da sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória. Em relação ao TEA, um ensaio clínico demonstrou que a administração de RSV como terapia adjuvante reduziu a hiperatividade dos pacientes comparados ao grupo placebo

(HENDOUEI *et al.*, 2020). Além disso, um estudo piloto com administração de RSV na dose de 200 mg/d durante 90 dias em indivíduos diagnosticados com TEA, demonstrou que o tratamento com RSV reduziu significativamente a irritabilidade e comportamentos anormais e aumentou a expressão de miR-195-5p, que age como modulador de alvos relacionados as vias inflamatórias e imunológicas (MARCHEZAN *et al.*, 2022).

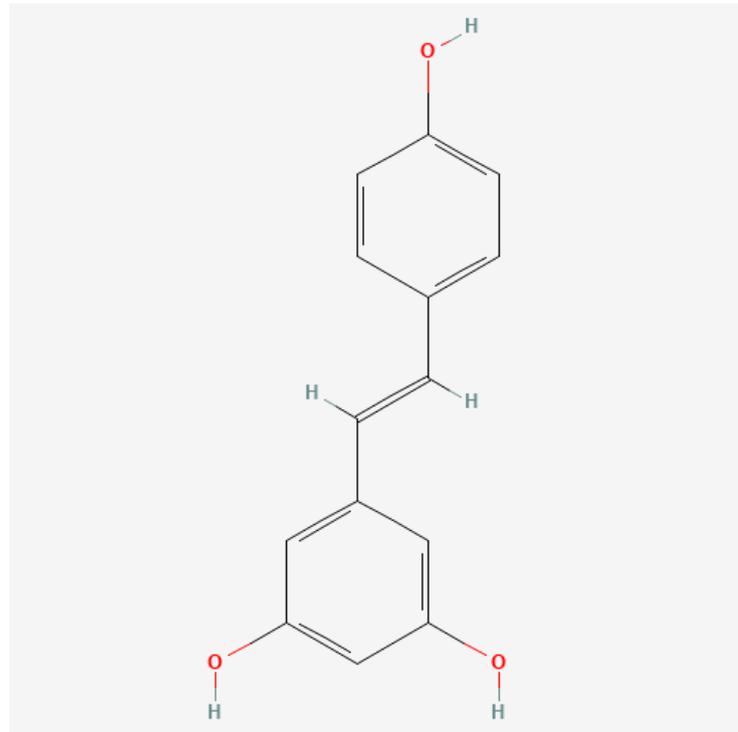


Figura 3. Estrutura do trans-resveratrol. Fonte: PubChem (ID: 445154)

Na pesquisa pré-clínica utilizando o modelo animal de autismo induzido por VPA, o RSV tem se mostrado uma molécula promissora para a compreensão da etiologia do TEA (revisado por SHAYGANFARD, 2020). Estudos têm evidenciado que a administração de RSV de forma intraútero, durante o desenvolvimento gestacional de roedores, foi capaz de prevenir alterações do tipo autista no comportamento social (BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2014), no comportamento sensorial e na organização celular neuronal em regiões corticais relacionadas ao processamento sensorial somático (FONTES-DUTRA *et al.*, 2018), bem como nas alterações moleculares (HIRSCH *et al.*, 2018), além de também prevenir alterações estruturais do hipocampo de longo prazo e organização interneuronal (SANTOS-TERRA *et al.*, 2021, 2022) e, prevenir o aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica e edema cerebral (DECKMANN *et al.*,

2021), em ratos Wistar pré-natalmente expostos ao VPA em um modelo animal de TEA. Especialmente no modelo VPA utilizando ratos Wistar, a além

Ainda, estudos indicam que as atividades moleculares do RSV mais evidenciados são os efeitos regulatórios na expressão de citocinas pró-inflamatórias, redução dos marcadores de estresse oxidativo e neuroinflamação, bem como a prevenção do aumento do miR134-5p (MALAGUARNERA; KHAN; CAULI, 2020). Um mecanismo já elucidado pelo qual o RSV regula a resposta inflamatória é através da regulação neuroimune pela modulação epigenética através sirtuína 1 (SIRT1), uma enzima da família das histonas desacetilases. A SIRT1 é uma enzima nuclear, que desempenha funções importantes na regulação inflamatória e que é ativada pelo RSV (GERTZ *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2020). Contudo, em modelos animais para acidentes vasculares cerebrais (HOU *et al.*, 2018; WANG, N. *et al.*, 2019) e culturas celulares de alguns tipos de câncer (CHAI *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2020), observa-se que o RSV interage com a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, atuando sobre as proteínas reguladoras Akt e PTEN, além de inibir diretamente a ação da mTOR através da competição por adenosina trifosfato (ATP) (PARK *et al.*, 2016).

Em relação à via Wnt/ β -catenina, estudos utilizando modelos animais com roedores para a indução de comportamentos do tipo depressivos mostram que o RSV é capaz de modular a via Wnt/ β -catenina através da reversão das atividades de fosforilação de GSK3 β e β -catenina, as quais se encontram alteradas nesses modelos (SHAYGANFARD, 2020; YANG; SONG; XU, 2017). Estudos relacionando o RSV com a via Wnt/ β -catenina em modelos de TEA são escassos, porém, investigações utilizando culturas celulares para alguns tipos de câncer indicam que o RSV atua modulando a sinalização Wnt/ β -catenina, reduzindo ou aumentando a sua atividade, de acordo com o contexto (DAI *et al.*, 2018; LI, L. *et al.*, 2021; XIANG *et al.*, 2021).

1.6. Biologia computacional

Abordagens computacionais que simulam as interações intermoleculares de complexos biológicos do tipo ligante-receptor são relevantes para o entendimento detalhado sobre os mecanismos de ligação e para a observação dessa dinâmica ao longo do tempo além de fornecer análises preditivas sobre parâmetros cinéticos e

termodinâmicos (SALMASO; MORO, 2018). Atualmente, são essenciais para orientar e melhorar as pesquisas de bancada, bem como o *design* e a otimização de moléculas (ligantes) (BRUCE *et al.*, 2018). Por outro lado, considerando que as características cinéticas de ligação dos complexos de proteínas-ligantes são determinantes para o desenho e/ou otimização de fármacos eficazes, as técnicas de simulação molecular para estimativa cinética de complexos fármaco-alvo estão aumentando em número (NUNES-ALVES; KOKH; WADE, 2020; SALO-AHEN *et al.*, 2020).

Entre as técnicas de simulação, uma das mais utilizadas é a Dinâmica Molecular clássica (DM), a qual tem a capacidade de fornecer informações sobre as propriedades estruturais, dinâmicas e termodinâmicas de sistemas moleculares complexos, como uma biomacromolécula flexível em um solvente aquoso. Buscando-se o aprimoramento desta técnica, diversos campos de força foram desenvolvidos ou aprimorados ao longo dos anos, com o objetivo de melhorar as representações de sistemas moleculares distintos para vários tipos de solutos e solventes (DE VIVO *et al.*, 2016; SALO-AHEN *et al.*, 2020).

Outra técnica de simulação frequentemente empregada para avaliar a ligação entre uma biomolécula (principalmente proteínas) e pequenos ligantes (normalmente pequenos compostos orgânicos) é o acoplamento molecular (também conhecido por *docking* molecular). Nesta técnica, um conjunto de coordenadas espaciais (também chamadas de pose) representando a geometria do ligante interagindo com a molécula alvo é produzido, e a energia livre de ligação (ΔG) ou uma pontuação de afinidade para cada complexo é calculada (PRIYA *et al.*, 2015). Em consonância com isso, o uso de simulações de DM combinadas com métodos para computação de afinidades de ligação proteína-ligante são ferramentas importantes para obter uma compreensão profunda das características moleculares das proteínas e suas mutações. Dentre esses métodos, a abordagem Mecânica Molecular/ Área de Superfície de Poisson-Boltzmann (MM/PBSA, *Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area*) é bastante popular para estimar a energia livre de ligação de pequenos ligantes à biomacromolécula (KUMARI; KUMAR; LYNN, 2014). Para realizar a análise de MM/PBSA, é necessário um conjunto conformacional representativo das flutuações que ocorrem no contato entre dois entes moleculares. Esse conjunto de conformações são extraídos de simulações de DM, o que torna a metodologia dependente do sistema utilizado (DO VALE HIPOLITO CAVALHEIRO; PIRES; DONG, 2017). O MM/PBSA também fornece a análise da

energia por interação de resíduos entre os alvos biológicos ligados à ligantes distintos, informações que são essenciais para classificar as contribuições individuais de aminoácidos, o efeito das mutações e para guiar o desenvolvimento racional de novos fármacos (POLI *et al.*, 2020).

Tendo em vista o estado da arte das pesquisas com o RSV em modelos animais de TEA e considerando que o modelo VPA ocasiona mutações genéticas indiretas através da sua ação sob as HDACs, um estudo baseado na elucidação da interação molecular do resveratrol e as proteínas-chave das vias PI3K/Akt/mTOR e Wnt/ β -catenina, considerando-se as principais mutações descritas no TEA, torna-se relevante e interessante como abordagem de estudos patofisiológicos e etiológicos de transtornos do neurodesenvolvimento, como o TEA.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Considerando que (i) o RSV apresenta um efeito preventivo das alterações induzidas pelo VPA em modelo animal de roedores; (ii) que o VPA atua sobre os mecanismos de regulação de expressão genética através da modulação da cromatina; (iii) que o RSV interage, direta e indiretamente, sobre as vias da PI3K/Akt/mTOR e Wnt/ β -catenina e, (iv) que essas vias apresentam mutações com alta confiabilidade de associação ao TEA, a hipótese do presente trabalho é a de que o RSV interage com certa afinidade com proteínas dessas vias e as mutações em proteínas-chaves dessas vias alteram essa afinidade de interação.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a interação entre o RSV e as proteínas/enzimas, selvagem e mutantes, das vias de sinalização mTOR, PI3K classe I e β -catenina através de abordagens de biologia computacional.

3.2. Objetivos específicos

- a. Determinar o efeito das mutações na organização estrutural das proteínas alvo;
- b. Determinar o grau de interação entre o RSV e as proteínas/enzimas selvagens e mutantes;
- c. Caracterizar as interações intermoleculares entre o RSV e as proteínas alvo.

PARTE II

Capítulo I

Artigo científico

PARTE III

4. DISCUSSÃO

Considerando que um dos mecanismos de ação elucidados para o modelo animal utilizando VPA é a inibição das desacetilases de histonas (HDAC), uma das ações do VPA pode ser a promoção da hiperacetilação das histonas H3 e H4 durante o período embrionário do neurodesenvolvimento dos roedores nesse modelo (KATAOKA *et al.*, 2013; MOLDRICH *et al.*, 2013), o que pode resultar em alterações epigenéticas importantes para o neurodesenvolvimento. Além disso, tendo em conta o efeito preventivo observado na administração do RSV nesse mesmo modelo, conjecturamos que talvez o RSV tenha a capacidade de interagir com os sítios catalíticos de enzimas importantes no contexto do neurodesenvolvimento, tanto em suas versões nativas quanto em mutações associadas ao TEA.

Nesse cenário, desregulações nas vias Wnt/ β -catenina e PI3K/mTOR, que são fundamentais para o neurodesenvolvimento, estão associadas ao TEA (GANESAN *et al.*, 2019; ROSINA *et al.*, 2019; UPADHYAY *et al.*, 2021). Para o desenvolvimento deste trabalho, buscamos na base de dados SFARI Gene (<https://gene.sfari.org/>) (SCHAAF *et al.*, 2020) mutações associadas ao TEA nas seguintes proteínas: classe I da família de PI3Ks, composta por p110 α , p110 β , p110 δ , p110 γ , p85 α , and p85 β , mTOR e β -catenina. Foram selecionadas duas mutações de p110 α , duas de p85 β , três de mTOR e dez de β -catenina que atendiam aos seguintes critérios de inclusão: (i) associação com TEA, identificada através das pontuações S – Síndromica, 1 – Alta confiança, 2 – Forte candidato e 3 – Evidência sugestiva do sistema de pontuação do SFARI Gene e, (ii) mutações no sítio catalítico ou até dez aminoácidos próximos, para enzimas; proximidade com os domínios nSH2 e iSH2 para p85 β e; proximidade com o sítio de ligação de TCF/LEF para β -catenina.

A via Wnt/ β -catenina é essencial para inúmeras funções, desde o desenvolvimento embrionário até o estágio adulto. Mutações somáticas no gene *CTNNB1* que resultam em ganho de função têm sido associadas à patofisiologia de alguns tipos de câncer (KATOH, 2018) e estratégias terapêuticas que visam reduzir a atividade e/ou evitar o acúmulo de β -catenina no núcleo celular também vêm sendo testadas (JI *et al.*, 2021; ZHANG, Y.; WANG, 2020). Por outro lado, mutações que resultam em perda de função nesse mesmo gene nas células germinativas de modelos animais têm sido

associadas à desregulação do desenvolvimento e à maturação neuronal (KUECHLER *et al.*, 2015). O estudo de mutações com perda de função em humanos indica uma forte associação entre elas e a deficiência intelectual (DE LIGT *et al.*, 2012; KUECHLER *et al.*, 2015), uma das características presentes em alguns indivíduos do TEA. Um estudo reportou que 9% das mutações *de novo* encontradas no gene *CTNNB1* associadas ao TEA derivam de variantes de nucleotídeo único (*single nucleotide variants*, SNVs) (IOSSIFOV *et al.*, 2014). De fato, a pesquisa deste trabalho mostrou que nove das dez mutações associadas ao TEA disponíveis no SFARI Gene resultam em proteínas com perda de função, devido à ocorrência de mutações do tipo *frameshit*, *deleções* e de mutações *nonsense*, quando um códon de parada é inserido prematuramente.

A R376H foi única mutação *missense* encontrada para β -catenina que atingiu os critérios de inclusão. Foi descrita por KRUPP *et al.*, (2017) em um estudo sobre fatores de riscos genéticos de alta confiança para o TEA. Nessa mutação ocorre a troca de uma arginina (R) na posição 376, que possui características hidrofílica, polar e carregada positivamente, por uma histidina (H), de mesmas características, porém contendo cadeia lateral aromática. Essa mutação está localizada entre as repetições três e quatro do domínio Armadillo. Os resultados da análise de raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) das trajetórias obtidas na DM aparentam indicar que a variante R376H apresenta certa rigidez na estrutura comparada à WT. Ao considerar as análises de raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF), a rigidez estrutural se torna mais acentuada, principalmente nos domínios N-terminal e C-terminal. Apesar do domínio tipo Armadillo ser o determinante para a função da β -catenina, a flexibilidade das suas extremidades terminais, as quais são intrinsecamente desordenadas, é essencial para regular as funções da proteína, como observado na regulação pelo complexo de destruição, na adesão à caderina e na translocação ao núcleo (ZHAO; XUE, 2016). Alterações nesses domínios podem gerar impactos negativos na atividade proteica. Os dados aqui obtidos evidenciam que a troca de aminoácido dessa região central da β -catenina foi capaz de alterar a flexibilidade das extremidades da estrutura. Essa alteração pode impactar negativamente a sinalização da via Wnt/ β -catenina no período de desenvolvimento intrauterino, visto que a flexibilidade dos domínios terminais da β -catenina é essencial que a proteína possa se translocar ao núcleo e lá exercer seus efeitos na transcrição

gênica. Se com a presença desta mutação, a atividade da via se torna reduzida, é possível que haja um envolvimento direto com o desenvolvimento do TEA. Apesar do estudo ter sido realizado apenas com a estrutura e mutações da β -catenina, outros pontos-chaves de regulação da via Wnt/ β -catenina são interessantes para trabalhos posteriores, como as proteínas envolvidas no complexo de destruição, principalmente a GSK3 β . Além disso, o envolvimento do RSV nessa via é um alvo interessante de estudo, visto que estudos indicam que o RSV possui a capacidade de modular a sinalização Wnt/ β -catenina através de mecanismos ainda pouco elucidados (GENOVESE *et al.*, 2022) e, que o tratamento de células-tronco neurais com VPA bem como a sua administração em roedores resulta em uma maior atividade dessa via (WANG, Li *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2019).

Assim como a via de sinalização Wnt/ β -catenina, a via PI3K/Akt/mTOR desempenha papel fundamental para o neurodesenvolvimento, bem como para a manutenção celular na idade adulta. Estudos recentes mostram a relação entre mutações nos genes *PIK3CA*, *PIK3R2*, *MTOR* em pacientes com TEA, macrocefalia e desenvolvimento tardio (MIRZAA *et al.*, 2016; YEUNG *et al.*, 2017). As mutações encontradas para o gene *PIK3CA* são classificadas como evidência sugestiva e resultam na troca de aminoácidos na estrutura da subunidade p110 α da PI3K α . Na mutação G914R há a troca de uma glicina(G), aminoácido hidrofóbico e neutro, por uma arginina (R), que possui características hidrofílicas e é polar, carregada positivamente. A mutação A1035T leva a troca de uma alanina (A) na posição 1035, que é um aminoácido de característica neutra e hidrofóbica, por uma treonina (T), aminoácido de característica polar, neutra e hidrofílica. Os resultados das análises de RMSD das trajetórias obtidas na DM indicam que as mutações não inserem variações significativas nas estruturas durante os 100ns avaliados, mantendo-se similares à WT. Em relação às simulações de *docking* molecular com o RSV, a mutação G914R da subunidade p110 α foi a com maior energia de atracamento e que manteve o complexo estabilizado durante, aproximadamente, 70ns. O complexo p110/p85 α WT – RSV, apesar dos valores de atracamento obtidos, não é estável ao longo dos 100ns e o complexo com a mutação A1035T apresenta tendência à estabilidade nos últimos 10ns de simulação. Os principais resíduos envolvidos ativamente na formação dos complexos foram Ile960, Ile828, Val878, Ile876, Met800 e Tyr864. Ainda, os aminoácidos que contribuíram com energia repulsivas foram Lys830, Asp838, Glu777

e Asp961. Mesmo com a repetição dos resíduos para os complexos, cada um apresentou diferentes energias para cada resíduo. A partir dos resultados obtidos é possível inferir que o RSV possui certa afinidade em inibir o sítio catalítico das mutações da p110 α e essa afinidade é reduzida na ligação com a estrutura WT, porém, estudos mais aprofundados são necessários para caracterizar esses mecanismos. Apesar dos resultados obtidos serem promissores, simulação de DM mais longas são necessárias para melhor avaliar o comportamento do complexo em tempos mais próximos aos tempos em que as reações biológicas são observadas. Uma vez que os dados referentes às mutações G914R e A1035T não indicam que há uma diferença significativa entre essas estruturas e a WT, não é possível afirmar se a atividade da enzima se encontra aumentada ou reduzida no contexto do TEA. Os dados promissores encontrados para a variante G914R podem ser resultado da troca de aminoácido, que ocorre diretamente no sítio catalítico. Porém, estudos demonstram que a administração de VPA resulta em maior atividade da via PI3K/Akt/mTOR, o que pode estar relacionado com a geração das mutações, visto que o VPA possui é capaz de interferir na regulação da transcrição gênica através da sua atividade de modulação epigenética (QIN; DAI; YIN, 2016). Considerando a capacidade mutagênica da administração de VPA no modelo de autismo em roedores e os dados aqui encontrados de uma possível predileção do RSV pelos sítios catalíticos das subunidades mutantes, é possível inferir que os achados encontrados por Fontes-Dutra *et al.*, (2018), nos quais o RSV apresenta efeito protetor das alterações comportamentais e moleculares, estejam de alguma forma conectados com os dados aqui apresentados.

A macrocefalia é definida como um tamanho de circunferência craniana desproporcionalmente aumentada, sendo a circunferência occipitofrontal maior ou igual a dois desvios padrão, e está presente em 14-34% em crianças com TEA (YEUNG *et al.*, 2017). Mutações nos genes *PIK3R2* e *MTOR* são encontradas em pacientes com macrocefalia e deficiência intelectual (NEGISHI *et al.*, 2017; REIJNDERS *et al.*, 2017; RIVIÈRE *et al.*, 2012). As mutações do gene *PIK3R2* são classificadas como síndromicas para TEA na base de dados SFARI Gene e resultam na troca de aminoácidos na estrutura proteica da subunidade p85 β da PI3K β . As mutações aqui exploradas (G373R e V398I) consistem na troca do aminoácido glicina (G) na posição 373, com característica neutra e hidrofóbica, por uma arginina (R), com

características hidrofílica e polar, carregada positivamente e, na troca de uma valina (V), de características hidrofóbica e neutra, por uma isoleucina (I), de mesmas características. Os resultados de RMSD indicaram que as mutações não inseriram variações significativas na dinâmica estrutural da proteína e nenhuma oscilação acima de 2 Å. Os resultados de RMSF mostraram que as mutações possuem um pico entre os resíduos 499-595 maior do que a WT, provavelmente resultado da troca de aminoácidos da mutação. Enquanto que os resultados das simulações de *docking* molecular entre a subunidade p85 β da PI3K β e o RSV mostraram força de interação similar entre os complexos selvagem e mutantes, cálculos de MM/PBSA mostram maior energia de ligação no complexo WT – RSV, seguido do complexo V398I – RSV e G373R – RSV. Em relação à DM dos complexos, a análise de RMSD dessas trajetórias indicaram que a ligação entre RSV e a mutação G373R é a mais estável dentre as análises realizadas, uma vez que o complexo permanece estável durante 60ns (entre 30ns e 90ns). Os resultados para a mutação V398I mostraram que o complexo se torna estável a partir de 60ns e permanece assim durante todo o tempo restante da simulação. Acerca dos resultados da contribuição individual dos resíduos para a formação do complexo, os dados para WT e para as mutações G373R e V398I são bastante divergentes, com a repetição de poucos aminoácidos. Nesse contexto, é possível parcialmente inferir que o RSV faz ligações mais estáveis com a PI3K β que possui a subunidade p85 β com as mutações avaliadas.

Da mesma forma que as PI3K α/β , mutações no gene da mTOR são associados à macrocefalia e ao TEA (GORDO *et al.*, 2018; MIRZAA *et al.*, 2016). As mutações de troca de aminoácido para a mTOR abordadas neste estudo são classificadas com alta confiança para o TEA no banco de dados SFARI Gene. Para a posição 2215 foram encontradas duas mutações atendendo aos critérios de inclusão. Na S2215Y, há a troca de uma serina (S) que possui as características neutra e hidrofílica, por uma tirosina (Y), que possui características hidrofóbica e aromática. Em S2215F há a troca da serina por uma fenilalanina (F), que possui característica aromática e hidrofóbica também. Na mutação F2202C ocorre a troca de uma fenilalanina por uma cisteína (C), com característica hidrofóbica e neutra. Os resultados referentes à análise de RMSD das trajetórias de DM das proteínas mostraram que as mutações S2215Y e S2215F geraram estruturas com alta instabilidade, se comparadas à trajetória da proteína mTOR WT, e com variações acima de 10 Å, indicando que as conformações que a

estrutura tridimensional atingiu durante os 100ns foram muito diferentes entre si. O que pode ter relação direta com a troca de características físico-químicas dos aminoácidos, uma vez que ambas trocam características neutras e hidrofílicas, por características aromáticas e hidrofóbicas. Por outro lado, a mutação F2202C resultou em uma estrutura mais rígida comparada à WT e bastante instável, que pode estar relacionada com a troca de uma fenilalanina (F), de característica aromática e hidrofóbica, por uma cisteína (C), contendo grupamento sulfúrio e com característica hidrofílica. A análise de RMSF foi coerente com os resultados de RMSD. Os resultados do *docking* molecular e a posterior análise por MM/PBSA mostraram uma problemática similar à encontrada nas mutações p85β. De acordo com o escore de afinidade da simulação de *docking*, as maiores energias de ligação são dos complexos S2215Y – RSV e S2215F – RSV. Entretanto, a análise de energia por MM/PBSA indica que as maiores energias de ligação são dos complexos F2202C – RSV e WT – RSV, o que é convergente com os resultados da DM dos complexos. A análise RMSD das trajetórias de DM dos complexos mostra que o complexo S2215Y – RSV apresentou uma tendência a estabilizar a partir dos 90ns, hipótese que precisa de mais simulações para ser comprovada. Além disso, o complexo F2202C – RSV foi o único que apresentou maior tempo de estabilização da ligação entre o RSV e o sítio catalítico da proteína. Nesse complexo, a estabilidade é atingida por volta dos 40ns e permanece até o fim da trajetória de 100ns. Com os dados obtidos, é possível inferir que o RSV possua maior afinidade de ligação ao sítio catalítico da forma mutante F2202C. Conforme esperado, em todos os complexos a ligação com o RSV acrescenta um pouco de estabilização à variação de RMSD da proteína. De maneira geral, os resíduos Trp2239, Ile2356, Lys2166, Ile2163 e Leu2185 são os que contribuem ativamente para a ligação do complexo e os resíduos Asp2357, Gln2167 e Gly2238 são os que exercem energia repulsiva na formação do complexo, com variação de energia para o complexo formado.

De forma geral, o conjunto de resultados obtidos com este trabalho indicam uma maior afinidade de ligação do RSV com os sítios ativos de algumas das mutações estudadas neste trabalho. Com os dados obtidos, não é possível inferir se as vias de sinalização com estas mutações se encontram com a atividade aumentada ou reduzida. Porém, ao traçar um paralelo com o modelo de autismo em roedores induzido por VPA, um inibidor de HDACs e que possui atividade mutagênica a partir

da modulação epigenética, é possível sugerir que possivelmente a administração de VPA em ratas prenhes talvez induza essas mutações.

Estudos *post-mortem* de cérebros de pacientes com TEA que analisaram o acetiloma, indicaram que em indivíduos com TEA, a acetilação de histonas é irregular e com altas taxas de alterações, que está relacionado com a epilepsia e impulsos neuronais (OZTENEKECIOGLU *et al.*, 2021). A redução na acetilação de DNA no TEA pode ser causada por diferentes condições, dentre elas, a sinalização de quimiocinas e atividade das HDACs (SUN *et al.*, 2016). Além disso, estudos com VPA *in vitro* e no modelo animal de roedores reforçam que uma das vias pelas quais o VPA induz comportamentos tipo-autista é a inibição de HDACs de classe I (CHANDA *et al.*, 2019). Com isso, a atividade das HDACs se encontra desregulada as histonas se tornam hiperacetiladas no modelo de autismo induzido por VPA, demonstrando os efeitos dessa molécula na modulação epigenética cerebral (LIU, H. *et al.*, 2021). Ademais, outro estudo comparou o modelo de indução do comportamento tipo-autista por VPA com a administração de valpromida, uma molécula análoga ao VPA, mas que não possui a atividade inibidora de HDACs. Os resultados demonstraram que os animais tratados com valpromida não apresentaram diferenças de comportamento do grupo controle, enquanto que o grupo VPA mostrou os comportamentos característicos tipo-autista (KATAOKA *et al.*, 2013).

Considerando que o RSV atua como um ativador de HDACs através da modulação de sirtuínas e que o VPA apresenta o efeito oposto, inibindo as HDACs, é possível sugerir que a ativação da SIRT1 seja um dos mecanismos pelos quais o RSV protege a prole dos efeitos do VPA. Além disso, tendo em vista a afinidade de ligação do RSV por as variantes mutadas abordadas neste trabalho, é possível sugerir que essas ligações sejam um dos mecanismos de ação pelo qual o RSV exerce efeito protetor, prevenindo as alterações moleculares e comportamentos sociais induzidos por VPA no modelo de indução de autismo.

Os presentes dados demonstram que a mutação R376H de β -catenina parcialmente interfere na flexibilidade estrutural da proteína e que o RSV possui (i) uma maior afinidade de ligação pelo sítio ativo da subunidade p110 α mutante G914R, (ii) pelo sítio ativo das subunidades p110 β que estão ligadas às subunidades regulatórias p85 β mutantes G373R e V398I, e (iii) pela mTOR contendo a mutação

F2202C. Os desfechos biológicos gerados a partir dessa maior afinidade de ligação ainda não são claros e demandam estudos *in silico* e *in vitro* mais aprofundados. Ademais, apesar dos resultados promissores, mais estudos são necessários para aprofundar o entendimento acerca dos dados encontrados aqui, principalmente no que tange à PI3K β . Além disso, uma abordagem interessante para aprofundar os conhecimentos seria a utilização de protocolos de simulações do tipo DM mais longas, com a finalidade de atingir tempos de equilíbrio mais próximos aos biológicos.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, o RSV apresentou maior afinidade de ligação com os sítios catalíticos de proteínas contendo mutações associadas ao TEA das enzimas PI3K α , PI3K β e mTOR, em comparação com as formas WT. Também foi possível observar que as mutações de β -catenina associadas ao TEA apresentam o caráter de perda de função, tanto em proteínas com terminação prematura quanto na proteína com a mutação R376H. Os resultados do presente trabalho são promissores e, esclarecem em parte, um possível mecanismo de ação do RSV nessas vias do neurodesenvolvimento que se encontram afetadas no TEA. Com isso, novos estudos *in vitro* e *in vivo*, utilizando o RSV e as mutações enzimáticas aqui trabalhadas, são necessários para que seja possível determinar a fundo os possíveis desfechos biológicos da maior afinidade de ligação entre o RSV e o sítio catalítico das mutações associadas ao TEA e analisar a possibilidade do RSV ter um efeito inibitório nas vias afetadas.

6. PERSPECTIVAS

Pode-se sugerir os seguintes trabalhos associados à esta pesquisa, em decorrência dos resultados obtidos:

- Investigar, com os mesmos protocolos, a proteína GSK3 β , visto que ela atua direta e indiretamente tanto na via Wnt/ β -catenina quanto na via PI3K/Akt/mTOR, sendo uma proteína convergente em ambas as vias;

- Também investigar as proteínas PTEN e Akt nos mesmos protocolos, visto que ambas estão envolvidas na via de sinalização da mTOR e que a PTEN já é considerada um gene de risco para o TEA;
- Reproduzir a DM dos complexos e mutações abordadas nesse estudo em simulações mais longas;
- Estudar a afinidade entre o RSV e os sítios alostéricos de PI3K α , PI3K β e mTOR e determinar de que forma essa ligação interferiria na ligação de inibidores conhecidos dos sítios catalíticos das proteínas;
- Estudar de forma *in vitro* e *in vivo* os resultados encontrados neste estudo.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [s. l.], v. 1–2, p. 19–25, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.SOFTX.2015.06.001>

ABRAHAMS, B. S. *et al.* SFARI Gene 2.0: A community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs). **Molecular Autism**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–3, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-36/TABLES/1>. Acesso em: 5 jul. 2022.

ABU-AMERO, K. K.; KONDKAR, A. A.; CHALAM, K. V. Resveratrol and ophthalmic diseases. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 200, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu8040200>

AHMAD, S. *et al.* Molecular docking, simulation and MM-PBSA studies of nigella sativa compounds: a computational quest to identify potential natural antiviral for COVID-19 treatment. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 39, n. 12, p. 4225–4233, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1775129>

ALZHRANI, A. S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 59, p. 125–132, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2019.07.009>

AMARO, R. E. *et al.* Ensemble Docking in Drug Discovery. **Biophysical journal**, [s. l.], v. 114, n. 10, p. 2271–2278, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2018.02.038>. Acesso em: 4 jul. 2022.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5^a ed.ed. Washington, EUA: American Psychiatric Publishing, 2013.

ARNOLD, A. *et al.* The majority of β -catenin mutations in colorectal cancer is homozygous. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1038, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07537-2>

BAE, S. M.; HONG, J. Y. The Wnt signaling pathway and related therapeutic drugs in autism spectrum disorder. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 129–135, 2018. Available at: <https://doi.org/10.9758/cpn.2018.16.2.129>

BAMBINI-JUNIOR, V. *et al.* Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. **Brain Research**, [s. l.], v. 1408, p. 8–16, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>

BAMBINI-JUNIOR, V. *et al.* Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 583, p. 176–181, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>

BEM, J. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling in brain development and mental disorders: keeping TCF7L2 in mind. **Febs Letters**, [s. l.], v. 593, n. 13, p. 1654, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13502>. Acesso em: 13 ago. 2022.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTQ662>. Acesso em: 14 jan. 2022.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, [s. l.], v. 91, n. 1–3, p. 43–56, 1995. Available at: [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E)

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>

BOTELHO, F. D. *et al.* Ligand-Based Virtual Screening, Molecular Docking, Molecular Dynamics, and MM-PBSA Calculations towards the Identification of Potential Novel Ricin Inhibitors. **Toxins**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 746, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins12120746>

BRUCE, N. J. *et al.* New approaches for computing ligand-receptor binding kinetics. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, Molecular and Cellular Modeling Group, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, Schloss-Wolfsbrunnenweg 35, 69118 Heidelberg, Germany. Molecular and Cellular Modeling Group, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, Schloss-Wolfsbrunnenweg 35, 69, v. 49, p. 1–10, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.001>

CARACCI, M. O. *et al.* Wnt/ β -Catenin-Dependent Transcription in Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 14, p. 263, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2021.764756/BIBTEX>

CASE, D. A. *et al.* The Amber biomolecular simulation programs. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 16, p. 1668–1688, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1002/JCC.20290>. Acesso em: 14 jan. 2022.

CHAI, R. *et al.* Resveratrol inhibits proliferation and migration through SIRT1 mediated post-translational modification of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 8037–8044, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3892/MMR.2017.7612/HTML>. Acesso em: 13 jan. 2022.

CHALIHA, D. *et al.* A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. **Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 12–48, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1159/000509109>

CHANDA, S. *et al.* Direct Reprogramming of Human Neurons Identifies MARCKSL1 as a Pathogenic Mediator of Valproic Acid-Induced Teratogenicity. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 103-119.e6, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.04.021>. Acesso em: 23 set. 2022.

CHEN, J.; ALBERTS, I.; LI, X. Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 35–41, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.03.006>

CHONG, Z. Z. *et al.* A critical kinase cascade in neurological disorders: PI3K, Akt and mTOR. <http://dx.doi.org/10.2217/fnl.12.72>, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 733–748, 2012. Available at: <https://doi.org/10.2217/FNL.12.72>. Acesso em: 12 jan. 2022.

CHRISTIANSON, A. L.; CHESTER, N.; KROMBERG, J. G. R. Fetal Valproate Syndrome: Clinical and Neuro-developmental Features in Two Sibling Pairs. **Developmental Medicine & Child Neurology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 361–369, 1994. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1994.tb11858.x>

CRINO, P. B. The mTOR signalling cascade: Paving new roads to cure neurological disease. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 379–392, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.81>

DAI, H. *et al.* Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer via the Wnt/ β -catenin pathway. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 1579, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3892/OL.2018.8772>. Acesso em: 13 jan. 2022.

DAURA, X. *et al.* Peptide folding: When simulation meets experiment. **Angewandte Chemie - International Edition**, [s. l.], v. 38, n. 1–2, p. 236–240, 1999. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-3773\(19990115\)38:1/2<236::aid-anie236>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-3773(19990115)38:1/2<236::aid-anie236>3.0.co;2-m)

DE LIGHT, J. *et al.* Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. [s. l.], v. 367, n. 20, p. 1921–1929, 2012. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23033978/>. Acesso em: 17 ago. 2022.

DE VIVO, M. *et al.* Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. **J. Med. Chem.**, Laboratory of Molecular Modeling and Drug Discovery, Istituto Italiano di Tecnologia, Via Morego 30, 16163 Genova, Italy. IAS-5/INM-9 Computational Biomedicine Forschungszentrum Jülich, Wilhelm-Johnen-Straße, 52428 Jülich, Germany. Department of Pharmacy, v. 59, n. 9, p. 4035–4061, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01684>

DECKMANN, I. *et al.* Resveratrol prevents brain edema, blood–brain barrier permeability, and altered aquaporin profile in autism animal model. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 81, n. 7, p. 579–604, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1002/jdn.10137>

DO VALE HIPOLITO CAVALHEIRO, J. P.; PIRES, N. M. M.; DONG, T. MM-PBSA: Challenges and opportunities. *In:* , 2017. **2017 10th International Congress on Image and Signal Processing, BioMedical Engineering and Informatics (CISP-BMEI)**. [S. l.]: IEEE, 2017. p. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1109/CISP-BMEI.2017.8302303>

DOLINSKY, T. J. *et al.* PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 35, n. Web Server, p. W522–W525, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm276>

DOLINSKY, Todd J. *et al.* PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 32, n. suppl_2, p. W665–W667, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH381>. Acesso em: 14 jan. 2022.

EISSA, N. *et al.* Current enlightenment about etiology and pharmacological treatment of autism spectrum disorder. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. MAY, p. 304, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/FNINS.2018.00304/BIBTEX>

EL SABEH, M. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling pathway in uterine leiomyoma: role in tumor biology and targeting opportunities. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 476, p. 3513–3536, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04174-6>. Acesso em: 20 jul. 2022.

ENRIQUEZ-BARRETO, L.; MORALES, M. The PI3K signaling pathway as a pharmacological target in Autism related disorders and Schizophrenia. **Molecular and Cellular Therapies**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 2, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/s40591-016-0047-9>

ESSMANN, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995. Available at:

<https://doi.org/10.1063/1.470117>. Acesso em: 14 jan. 2022.

EVANGELISTA FALCON, W. *et al.* Ensemble Docking in Drug Discovery: How Many Protein Configurations from Molecular Dynamics Simulations are Needed To Reproduce Known Ligand Binding? **The Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], v. 123, n. 25, p. 5189–5195, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b11491>

EVANGELISTI, C. *et al.* Crosstalks of GSK3 signaling with the mTOR network and effects on targeted therapy of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1867, n. 4, p. 118635, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118635>

FIGLIA, G.; GERBER, D.; SUTER, U. Myelination and mTOR. **Glia**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 693–707, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1002/GLIA.23273>. Acesso em: 20 jul. 2022.

FITZGERALD, T. W. *et al.* Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. **Nature**, [s. l.], v. 519, n. 7542, p. 223–228, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature14135>

FONTES-DUTRA, M. *et al.* Resveratrol prevents cellular and behavioral sensory alterations in the animal model of autism induced by valproic acid. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 9, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00009>

GANESAN, H. *et al.* mTOR signalling pathway - A root cause for idiopathic autism? **BMB Reports**, [s. l.], v. 52, n. 7, p. 424–433, 2019. Available at: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.7.137>

GENOVESE, T. *et al.* Resveratrol Inhibition of the WNT/ β -Catenin Pathway following Discogenic Low Back Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 4092, 2022. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23084092>

GERTZ, M. *et al.* A Molecular Mechanism for Direct Sirtuin Activation by Resveratrol. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. e49761, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049761>

GILBERT, J.; MAN, H. Y. Fundamental elements in autism: From neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2017. Available at: <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00359>

GORDO, G. *et al.* mTOR mutations in Smith-Kingsmore syndrome: Four additional patients and a review. **Clinical Genetics**, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 762–775, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1111/cge.13135>

GOTTFRIED, C; QUINCOZES-SANTOS, K.; BASLI, T. **Resveratrol and Neuroprotection**. [S. l.]: Nova Publisher, 2011.

GOTTFRIED, Carmem *et al.* The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in psychiatry**, [s. l.], v. 6, n. SEP, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2015.00121>. Acesso em: 11 jan. 2022.

GROSS, C.; BASSELL, G. J. Neuron-specific regulation of class I PI3K catalytic subunits and their dysfunction in brain disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 7, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00012>

GU, J. *et al.* Neuroprotective Effect of Trans-Resveratrol in Mild to Moderate Alzheimer Disease: A Randomized, Double-Blind Trial. **Neurology and Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 905–917, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1007/S40120-021-00271-2/FIGURES/3>. Acesso em: 17 ago. 2022.

HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 1–17, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17/FIGURES/14>. Acesso em: 14 jan. 2022.

HENDOUEI, F. *et al.* Resveratrol as adjunctive therapy in treatment of irritability in children with autism: A double-blind and placebo-controlled randomized trial. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 324–334, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1111/JCPT.13076>. Acesso em: 17 ago. 2022.

HESS, B. *et al.* LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)

HIRSCH, M. M. *et al.* Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 115, p. 336–343, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.061>

HODGES, H.; FEALKO, C.; SOARES, N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. **Translational Pediatrics**, [s. l.], v. 9, n. S1, p. S55–S65, 2020. Available at: <https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.09>

HOU, Y. *et al.* Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats. **Genes & Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 245–255, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2018.06.001>

HU; DEVLIN; DEBSKI. ASD Phenotype—Genotype Associations in Concordant and Discordant Monozygotic and Dizygotic Twins Stratified by Severity of Autistic Traits. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 15, p. 3804, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20153804>

HUANG, J. *et al.* Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 40716, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep40716>

HUTSLER, J. J.; ZHANG, H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. **Brain Research**, [s. l.], v. 1309, p. 83–94, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2009.09.120>

IKSEN; POTHONGSRISIT, S.; PONGRAKHANANON, V. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products. **Molecules** **2021**, Vol. 26, Page 4100, [s. l.], v. 26, n. 13, p. 4100, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26134100>. Acesso em: 12 jan. 2022.

IOSSIFOV, I. *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. **Nature**, [s. l.], v. 515, n. 7526, p. 216–221, 2014. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25363768/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

JARDIM, F. R. *et al.* Resveratrol and Brain Mitochondria: a Review. **Molecular**

Neurobiology, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 2085–2101, 2018. Available at:
<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0448-z>

JEAN, S.; KIGER, A. A. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 127, n. 5, p. 923–928, 2014. Available at:
<https://doi.org/10.1242/JCS.093773/-/DC1>. Acesso em: 12 jan. 2022.

JI, Y. *et al.* Therapeutic strategies targeting Wnt/ β -catenin signaling for colorectal cancer (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 1, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5056>

JORGENSEN, W. L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 926, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.445869>. Acesso em: 14 jan. 2022.

JUNG, G.-A. *et al.* Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway. **BMC Cell Biology**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 66, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-66>

JURRUS, E. *et al.* Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 112–128, 2018. Available at:
<https://doi.org/10.1002/PRO.3280>. Acesso em: 14 jan. 2022.

KATAOKA, S. *et al.* Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 91–103, 2013. Available at:
<https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>. Acesso em: 23 set. 2022.

KATOH, M. Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 713–725, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3689>

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols** 2015 10:6, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>. Acesso em: 23 jun. 2022.

KHAN, K. *et al.* Resveratrol, curcumin, paclitaxel and miRNAs mediated regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway: go four better to treat bladder cancer. **Cancer Cell International** 2020 20:1, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–19, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/S12935-020-01660-7>. Acesso em: 13 jan. 2022.

KHARBANDA, M. *et al.* Clinical features associated with CTNNB1 de novo loss of function mutations in ten individuals. **European Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 130–135, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.11.008>

KIM, J.; GUAN, K. L. mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth. **Nature cell biology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 63–71, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41556-018-0205-1>. Acesso em: 12 jan. 2022.

KIM, S.; JEONG, S. Mutation Hotspots in the β -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases. **Molecules and Cells**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 8, 2019. Available at: <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2018.0436>. Acesso em: 13 ago. 2022.

KRUPP, D. R. *et al.* Exonic Mosaic Mutations Contribute Risk for Autism Spectrum Disorder. **American journal of human genetics**, [s. l.], v. 101, n. 3, p. 369–390, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2017.07.016>. Acesso em: 6 jul. 2022.

KUECHLER, A. *et al.* De novo mutations in beta-catenin (CTNNB1) appear to be a frequent cause of intellectual disability: expanding the mutational and clinical spectrum. **Human Genetics**, [s. l.], v. 134, n. 1, p. 97–109, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00439-014-1498-1/FIGURES/2>. Acesso em: 2 ago. 2022.

KUMAR, S. *et al.* Impaired neurodevelopmental pathways in autism spectrum disorder: a review of signaling mechanisms and crosstalk. **Journal of Neurodevelopmental Disorders** 2019 11:1, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–14, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1186/S11689-019-9268-Y>. Acesso em: 13 jan. 2022.

KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 1951–1962, 2014. Available at: https://doi.org/10.1021/CI500020M/SUPPL_FILE/CI500020M_SI_001.PDF. Acesso

em: 12 ago. 2022.

KWAN, V.; UNDA, B. K.; SINGH, K. K. Wnt signaling networks in autism spectrum disorder and intellectual disability. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 45, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/s11689-016-9176-3>

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>. Acesso em: 6 jul. 2022.

LELIEVELD, S. H. *et al.* Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 1194–1196, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.4352>

LEVITT, P.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Neurodevelopment and the Origins of Brain Disorders. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1038/NPP.2014.237>. Acesso em: 12 jan. 2022.

LI, J.; KIM, S. G.; BLENIS, J. Rapamycin: One Drug, Many Effects. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 373–379, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>

LI, L. *et al.* Resveratrol prevents inflammation and oxidative stress response in LPS-induced human gingival fibroblasts by targeting the PI3K/AKT and Wnt/ β -catenin signaling pathways. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 44, n. 3, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0349>. Acesso em: 13 jan. 2022.

LICAUSI, F.; HARTMAN, N. W. Role of mTOR Complexes in Neurogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 5, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS19051544>. Acesso em: 11 jan. 2022.

LIM, H. K.; YOON, J. H.; SONG, M. Autism Spectrum Disorder Genes: Disease-Related Networks and Compensatory Strategies. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 15, 2022. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.922840>

LIMMONGKON, A. *et al.* Antioxidant activity, total phenolic, and resveratrol content in five cultivars of peanut sprouts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 332–338, 2017. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.002>

LIU, H. *et al.* Valproic Acid Induces Autism-Like Synaptic and Behavioral Deficits by Disrupting Histone Acetylation of Prefrontal Cortex ALDH1A1 in Rats. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 15, 2021. Available at:

<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.641284>

LIU, J. *et al.* Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 3, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>. Acesso em: 5 jul. 2022.

LORD, C. *et al.* Autism spectrum disorder. **Nature Reviews Disease Primers** 2020 **6:1**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–23, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0138-4>. Acesso em: 10 jan. 2022.

MA, X. R. *et al.* Neuroprotective Effect of Resveratrol via Activation of Sirt1 Signaling in a Rat Model of Combined Diabetes and Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 13, p. 1400, 2020. Available at:

<https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.01400/BIBTEX>

MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 9–26, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>

MAENNER, M. J. *et al.* Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. **MMWR. Surveillance Summaries**, [s. l.], v. 70, n. 11, p. 1–16, 2021. Available at: <https://doi.org/10.15585/MMWR.SS7011A1>. Acesso em: 10 jan. 2022.

MALAGUARNERA, M.; KHAN, H.; CAULI, O. Resveratrol in autism spectrum disorders: Behavioral and molecular effects. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 1–13, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox9030188>

MARCHEZAN, J. *et al.* Resveratrol Treatment of Autism Spectrum Disorder—A Pilot Study. **Clinical Neuropharmacology**, [s. l.], v. Publish Ah, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000516>

MCLEOD, F.; SALINAS, P. C. Wnt proteins as modulators of synaptic plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v. 53, p. 90–95, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.06.003>

MIRZAA, G. M. *et al.* Association of MTOR Mutations With Developmental Brain Disorders, Including Megalencephaly, Focal Cortical Dysplasia, and Pigmentary Mosaicism. **JAMA Neurology**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 836–845, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.0363>. Acesso em: 13 jan. 2022.

MOHAMMADI, S. *et al.* Ensemble learning from ensemble docking: revisiting the optimum ensemble size problem. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 410, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04448-5>

MOLDRICH, R. X. *et al.* Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 257, p. 253–264, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2013.09.049>

MONIES, D. *et al.* Lessons Learned from Large-Scale, First-Tier Clinical Exome Sequencing in a Highly Consanguineous Population. [s. l.], v. 104, n. 6, p. 1182–1201, 2019. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31130284/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

MORAES, D. S. *et al.* Sirtuins, brain and cognition: A review of resveratrol effects. **IBRO Reports**, [s. l.], v. 9, p. 46–51, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2020.06.004>

NATH, J. *et al.* Resveratrol as a therapeutic choice for traumatic brain injury: An insight into its molecular mechanism of action. **Brain Disorders**, [s. l.], v. 6, p. 100038, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.DSCB.2022.100038>

NEGISHI, Y. *et al.* A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly. **BMC Medical Genetics**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0363-6>

NICOLINI, C. *et al.* Decreased mTOR signaling pathway in human idiopathic autism and in rats exposed to valproic acid. **Acta neuropathologica communications**, [s. l.], v. 3, p. 3, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1186/S40478-015-0184-4>. Acesso em: 13 jan. 2022.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 299, p. 217–227, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>. Acesso em: 13 jan. 2022.

NUNES-ALVES, A.; KOKH, D. B.; WADE, R. C. Recent progress in molecular simulation methods for drug binding kinetics. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, Molecular and Cellular Modeling Group, Heidelberg Institute for Theoretical Studies, Schloss-Wolfsbrunnenweg 35, 69118 Heidelberg, Germany; Center for Molecular Biology (ZMBH), DKFZ-ZMBH Alliance, Heidelberg University, Im Neuenheimer Feld 282, 69120 Heid, v. 64, p. 126–133, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.022>

NUNES AZEVEDO, F. F. *et al.* Binding site hotspot map of PI3K α and mTOR in the presence of selective and dual ATP-competitive inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], p. 1–13, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2016487>

O'ROAK, B. J. *et al.* Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. **Science**, [s. l.], v. 338, n. 6114, p. 1619–1622, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1227764>

OH, W. J.; JACINTO, E. mTOR complex 2 signaling and functions. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 10, n. 14, p. 2305, 2011. Available at: <https://doi.org/10.4161/CC.10.14.16586>. Acesso em: 12 jan. 2022.

OZTENEKECIOGLU, B. *et al.* Genetic and Epigenetic Alterations in Autism Spectrum Disorder. **Global Medical Genetics**, [s. l.], v. 08, n. 04, p. 144–148, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1735540>

PAPLOMATA, E.; O'REGAN, R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 154, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1177/1758834014530023>.

Acesso em: 21 jul. 2022.

PARK, D. *et al.* Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. **Scientific Reports** **2016** **6:1**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016.

Available at: <https://doi.org/10.1038/srep21772>. Acesso em: 13 jan. 2022.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, [s. l.], v. 52, n. 12, p.

7182, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1063/1.328693>. Acesso em: 14 jan. 2022.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein science : a publication of the Protein Society**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1002/PRO.3943>.

Acesso em: 9 jun. 2022.

POLI, G. *et al.* Application of MM-PBSA Methods in Virtual Screening. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1971, 2020. Available at:

<https://doi.org/10.3390/molecules25081971>

PONDER, J. W.; CASE, D. A. Protein Simulations. **Advances in Protein Chemistry**, [s. l.], v. 66, p. 27–85, 2003. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006532330366002X>

PRIYA, R. *et al.* Molecular Docking and Molecular Dynamics to Identify a Novel Human Immunodeficiency Virus Inhibitor from Alkaloids of *Toddalia asiatica*.

Pharmacogn. Mag., Plant Biotechnology, School of Bio Sciences and Technology, VIT University, Vellore, Tamil Nadu, India. Department of Neurophysiology, National Institute of Mental Health and Neuro Sciences, Bengaluru, Karnataka, India., v. 11, n. Suppl 3, p. S414-22, 2015. Available at: <https://doi.org/10.4103/0973-1296.168947>

QIN, L.; DAI, X. Effect of sulindac on improving autistic behaviors in rats. **Journal of Southern Medical University**, [s. l.], v. 35, n. 8, p. 1162–1165, 2015. Available at:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26277514/>. Acesso em: 19 set. 2022.

QIN, L.; DAI, X.; YIN, Y. Valproic acid exposure sequentially activates Wnt and mTOR pathways in rats. **Molecular and Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 75, p. 27–

35, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.06.004>

RAUF, A. *et al.* A comprehensive review of the health perspectives of resveratrol. **Food and Function**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 4284–4305, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1039/c7fo01300k>

REIJNDERS, M. R. F. *et al.* Variation in a range of mTOR-related genes associates with intracranial volume and intellectual disability. [s. l.], v. 8, 2017. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29051493/>. Acesso em: 13 jan. 2022.

RIVIÈRE, J. B. *et al.* De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 934–940, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.2331>

ROBERTSON, I. *et al.* The science of resveratrol, formulation, pharmacokinetic barriers and its chemotherapeutic potential. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 618, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.121605>

RODIER, P. M. *et al.* Linking etiologies in humans and animal models: Studies of autism. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 11, n. 2–3, p. 417–422, 1997. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(97\)80001-U](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(97)80001-U)

ROSENBERG, R. E. *et al.* Characteristics and Concordance of Autism Spectrum Disorders Among 277 Twin Pairs. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, [s. l.], v. 163, n. 10, p. 907, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1001/archpediatrics.2009.98>

ROSINA, E. *et al.* Disruption of mTOR and MAPK pathways correlates with severity in idiopathic autism. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 9, n. 50, p. 1–10, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0335-z>

SABATINI, D. M. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 114, n. 45, p. 11818–11825, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1716173114>. Acesso em: 12 jan. 2022.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in**

Pharmacology, [s. l.], v. 9, 2018. Available at:

<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>

SALO-AHEN, O. M. H. *et al.* Molecular Dynamics Simulations in Drug Discovery and Pharmaceutical Development. **Processes**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 71, 2020. Available at:

<https://doi.org/10.3390/pr9010071>

SAMAEI, A. *et al.* Resveratrol Adjunct Therapy for Negative Symptoms in Patients With Stable Schizophrenia: A Double-Blind, Randomized Placebo-Controlled Trial.

The international journal of neuropsychopharmacology, [s. l.], v. 23, n. 12, p.

775–782, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1093/IJNP/PYAA006>. Acesso em: 17 ago. 2022.

SANDIN, S. *et al.* The Heritability of Autism Spectrum Disorder. **JAMA**, [s. l.], v. 318, n. 12, p. 1182, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.12141>

SANNER, M. F. A component-based software environment for visualizing large macromolecular assemblies. **Structure**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 447–462, 2005.

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.01.010>

SANTOS-TERRA, J. *et al.* Resveratrol Prevents Cytoarchitectural and Interneuronal Alterations in the Valproic Acid Rat Model of Autism. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 4075, 2022. Available at:

<https://doi.org/10.3390/ijms23084075>

<https://doi.org/10.3390/ijms23084075>

SANTOS-TERRA, J. *et al.* Resveratrol prevents long-term structural hippocampal alterations and modulates interneuron organization in an animal model of ASD. **Brain Research**, [s. l.], v. 1768, 2021. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147593>

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147593>

SANTOS, L. H. S.; FERREIRA, R. S.; CAFFARENA, E. R. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 2053, p. 13–34, 2019. Available at:

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_2. Acesso em: 5 jul. 2022.

SATTERSTROM, F. K. *et al.* Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. **Cell**, [s. l.], v. 180, n. 3, p. 568-584.e23, 2020. Available at:

<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.12.036>. Acesso em: 6 jul. 2022.

SAXTON, R. A.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 6, p. 960, 2017. Available at:

<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.02.004>. Acesso em: 12 jan. 2022.

SCHAAF, C. P. *et al.* A framework for an evidence-based gene list relevant to autism spectrum disorder. **Nature reviews. Genetics**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 367–376, 2020.

Available at: <https://doi.org/10.1038/S41576-020-0231-2>. Acesso em: 14 jan. 2022.

SCHAFER, S. T. *et al.* Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons. **Nature Neuroscience** 2019 **22:2**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 243–255, 2019. Available at:

<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0295-x>. Acesso em: 5 jul. 2022.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>

SCHRÖDINGER, LLC. **The {AxPyMOL} Molecular Graphics Plugin for {Microsoft PowerPoint}, Version~1.8**. [S. l.: s. n.], 2015.

SELVARANI, R.; MOHAMMED, S.; RICHARDSON, A. Effect of rapamycin on aging and age-related diseases—past and future. **GeroScience**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 1135–1158, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00274-1>

SHARMA, A.; MEHAN, S. Targeting PI3K-AKT/mTOR signaling in the prevention of autism. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 147, n. April, p. 105067, 2021.

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105067>. Acesso em: 12 jan. 2022.

SHAYGANFARD, M. Molecular and biological functions of resveratrol in psychiatric disorders: a review of recent evidence. **Cell & Bioscience** 2020 **10:1**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13578-020-00491-3>. Acesso em: 13 jan. 2022.

SOUSA DA SILVA, A. W.; VRANKEN, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interfacE. **BMC Research Notes**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–8, 2012. Available at:

<https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367/FIGURES/3>. Acesso em: 14 jan. 2022.

STUMP, B. *et al.* Glycogen synthase kinase 3- β inhibition induces lymphangiogenesis through β -catenin-dependent and mTOR-independent pathways. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. e0213831, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213831>

SUBRAMANIAN, M. *et al.* Characterizing autism spectrum disorders by key biochemical pathways. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 9, n. SEP, p. 313, 2015. Available at: <https://doi.org/10.3389/FNINS.2015.00313/BIBTEX>

SUN, W. *et al.* Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. **Cell**, [s. l.], v. 167, n. 5, p. 1385-1397.e11, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.031>

TAKATA, A. *et al.* Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. **Cell Reports**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 734–747, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.074>

TARANTELLI, C. *et al.* Is There a Role for Dual PI3K/mTOR Inhibitors for Patients Affected with Lymphoma? **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 3, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS21031060>. Acesso em: 12 jan. 2022.

TARTAGLIONE, A. M. *et al.* Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 159, n. January, p. 107477, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.024>

TIAN, C. *et al.* ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 528–552, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>

TRAMUTOLA, A. *et al.* Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnesic mild cognitive impairment and late-stage AD. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 133, n. 5, p. 739–749, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/JNC.13037>. Acesso em: 12 jan. 2022.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading.

Journal of computational chemistry, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 455, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1002/JCC.21334>. Acesso em: 14 jan. 2022.

UPADHYAY, J. *et al.* Dysregulation of Multiple Signaling Neurodevelopmental Pathways during Embryogenesis: A Possible Cause of Autism Spectrum Disorder.

Cells 2021, Vol. 10, Page 958, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 958, 2021. Available at: <https://doi.org/10.3390/CELLS10040958>. Acesso em: 11 jan. 2022.

VALENTA, T.; HAUSMANN, G.; BASLER, K. The many faces and functions of β -catenin. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 2714–2736, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>

VANG, O. *et al.* What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e19881, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019881>

WANG, Li *et al.* Wnt signaling pathway participates in valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells. **International journal of clinical and experimental pathology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 578–585, 2015. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755748>

WANG, Long *et al.* Brain Development and Akt Signaling: the Crossroads of Signaling Pathway and Neurodevelopmental Diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 61, n. 3, 2017. Available at: </pmc/articles/PMC5344939/>. Acesso em: 11 jan. 2022.

WANG, N. *et al.* Resveratrol Activates Autophagy via the AKT/mTOR Signaling Pathway to Improve Cognitive Dysfunction in Rats With Chronic Cerebral Hypoperfusion. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 13, p. 859, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00859/BIBTEX>

WANG, Y.; WU, Y.; PENG, S. Resveratrol inhibits the inflammatory response and oxidative stress induced by uterine ischemia reperfusion injury by activating PI3K-AKT pathway. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. e0266961, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0266961>. Acesso em: 5 jul. 2022.

WATERHOUSE, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKY427>. Acesso em: 14 jan. 2022.

WINCZEWSKA-WIKTOR, A. *et al.* A de novo CTNNB1 nonsense mutation associated with syndromic atypical hyperekplexia, microcephaly and intellectual disability: a case report. **BMC Neurology**, [s. l.], v. 16, n. 35, 2016. Available at: </pmc/articles/PMC4788907/>. Acesso em: 2 ago. 2022.

WINDEN, K. D.; EBRAHIMI-FAKHARI, D.; SAHIN, M. Abnormal mTOR Activation in Autism. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061747>, [s. l.], v. 41, p. 1–23, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-080317-061747>. Acesso em: 13 jan. 2022.

WU, D.; PAN, W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 161–168, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.002>

XIA, N.; FORSTERMANN, U.; LI, H. Resveratrol as a gene regulator in the vasculature. **Current pharmaceutical biotechnology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 401–408, 2014. Available at: <https://doi.org/10.2174/1389201015666140711114450>. Acesso em: 5 jul. 2022.

XIANG, Z. *et al.* Resveratrol promotes axonal regeneration after spinal cord injury through activating Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Aging (Albany NY)**, [s. l.], v. 13, n. 20, p. 23603, 2021. Available at: <https://doi.org/10.18632/AGING.203628>. Acesso em: 13 jan. 2022.

XU, D.; ZHANG, Y. Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization. **Biophysical Journal**, [s. l.], v. 101, n. 10, p. 2525–2534, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.10.024>

XU, F. *et al.* RETRACTED ARTICLE: Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. **Cell & Bioscience 2020 10:1**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13578-020-00416-0>. Acesso em: 12 jan. 2022.

YANG, X. H.; SONG, S. Q.; XU, Y. Resveratrol ameliorates chronic unpredictable mild stress-induced depression-like behavior: involvement of the HPA axis, inflammatory markers, BDNF, and Wnt/ β -catenin pathway in rats. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, [s. l.], v. 13, p. 2727, 2017. Available at: <https://doi.org/10.2147/NDT.S150028>. Acesso em: 13 jan. 2022.

YEUNG, K. S. *et al.* Identification of mutations in the PI3K-AKT-mTOR signalling pathway in patients with macrocephaly and developmental delay and/or autism. **Molecular Autism**, [s. l.], v. 8, p. 1–11, 2017. Available at: <https://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13229-017-0182-4>. Acesso em: 13 jan. 2022.

ZEIDAN, J. *et al.* Global prevalence of autism: A systematic review update. **Autism Research**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 778–790, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1002/AUR.2696>. Acesso em: 16 maio 2022.

ZENG, Q. *et al.* Valproic Acid Stimulates Hippocampal Neurogenesis via Activating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in the APP/PS1/Nestin-GFP Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 11, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00062>

ZHANG, X.; PEREZ-SANCHEZ, H.; C. LIGHTSTONE, F. A Comprehensive Docking and MM/GBSA Rescoring Study of Ligand Recognition upon Binding Antithrombin. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 14, p. 1631–1639, 2017. Available at: <https://doi.org/10.2174/1568026616666161117112604>

ZHANG, Y.; WANG, X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. **Journal of Hematology & Oncology 2020 13:1**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–16, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1186/S13045-020-00990-3>. Acesso em: 17 ago. 2022.

ZHAO, B.; XUE, B. Self-regulation of functional pathways by motifs inside the disordered tails of beta-catenin. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 513–526, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/S12864-016-2825-9/FIGURES/6>. Acesso em: 17 ago. 2022.