



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Curso de Biomedicina

IVERSON CONRADO BEZERRA

**ESTUDO COMPUTACIONAL DO MODULADOR
ALOSTÉRICO POSITIVO DO RECEPTOR $\alpha 7$ DE
ACETILCOLINA ($\alpha 7$ nAChR) PNU-120596 SOBRE AS
PROTEÍNAS REGULADORAS DO PROCESSAMENTO
DA MEMÓRIA DE MEDO**

Recife
2023

**ESTUDO COMPUTACIONAL DO MODULADOR
ALOSTÉRICO POSITIVO DO RECEPTOR $\alpha 7$ DE
ACETILCOLINA ($\alpha 7$ nAChR) PNU-120596 SOBRE AS
PROTEÍNAS REGULADORAS DO PROCESSAMENTO DA
MEMÓRIA DE MEDO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Dr^a Priscila Gubert.

Coorientador: Dr^a Michelle Melgarejo da Rosa.

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Bezerra, Iverson Conrado.

Estudo computacional do modulador alostérico positivo do receptor $\alpha 7$ de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR) PNU-120596 sobre as proteínas reguladoras do processamento da memória de medo / Iverson Conrado Bezerra. - Recife, 2023. 63 : il., tab.

Orientador(a): Priscila Gubert

Coorientador(a): Michelle Melgarejo da Rosa

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. Memória de medo. 2. Docking molecular. 3. Bioinformática. 4. Biologia de sistemas. 5. Sistema nervoso. I. Gubert, Priscila. (Orientação). II. Rosa, Michelle Melgarejo da. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

**ESTUDO COMPUTACIONAL DO MODULADOR
ALOSTÉRICO POSITIVO DO RECEPTOR $\alpha 7$ DE
ACETILCOLINA ($\alpha 7$ nAChR) PNU-120596 SOBRE AS
PROTEÍNAS REGULADORAS DO PROCESSAMENTO DA
MEMÓRIA DE MEDO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: 21/09/2023

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dr^a. Priscila Gubert
Instituto Keizo Asami iLIKA-UFPE/ Departamento de Bioquímica

Dr. Carlos Henrique Castelletti
Instituto Keizo Asami iLIKA-UFPE

Dr. Gabriel Aires Urquiza de Carvalho
Instituto Keizo Asami iLIKA-UFPE

AGRADECIMENTOS

É com imensa gratidão que expresso meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram de maneira significativa para a realização deste Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina. Primeiramente, quero agradecer aos professores que, com sua dedicação e conhecimento, orientaram-me ao longo deste processo, em especial a minha orientadora Prof(a). Dr(a). Priscila Gubert e coorientadora Prof(a). Dr(a). Michele Melgarejo da Rosa. Suas orientações foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho, proporcionando não apenas conhecimento técnico, mas também um crescimento pessoal e acadêmico. Aos colegas de curso, que compartilharam suas experiências, ideias e apoio, agradeço pela colaboração e amizade ao longo dessa jornada. Juntos, enfrentamos desafios, trocamos conhecimentos e construímos laços que levaremos para toda a vida. À minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo suporte emocional e encorajamento nos momentos mais desafiadores. Seu apoio incondicional foi a luz que guiou meus passos durante todo o processo de pesquisa e escrita. Não posso deixar de agradecer às instituições, laboratórios e profissionais que disponibilizaram recursos, materiais e informações essenciais para a realização deste trabalho. A colaboração de vocês foi fundamental para a qualidade e relevância deste estudo. Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Este TCC não seria possível sem a ajuda, apoio e confiança de cada um de vocês.

Muito obrigado!

Atenciosamente,

Iverson Conrado

“Todo mundo tem um pouco de loucura. Vou lhes fazer um pedido: Vivam a imaginação, pois ela é a nossa realidade mais profunda”

(Nise da Silveira)

RESUMO

O medo, emoção desencadeada em resposta ao perigo ou ameaça, é essencial para a sobrevivência humana. No entanto, grande parte da população experimenta episódios de medo constante ou recorrente, acompanhados de sofrimentos físicos e psicológicos. A memória de medo compreende um processo cognitivo para o processamento do medo estando desregulada em alguns transtornos mentais, como nos transtornos de ansiedade. Os medicamentos existentes para o tratamento de transtornos relacionados ao medo possuem diversas limitações, sendo a descoberta de novas alternativas terapêuticas de caráter emergencial. O PNU-120596 é um modulador alostérico positivo do receptor $\alpha 7$ de Acetilcolina desenvolvido a fim de estudar as modificações comportamentais decorrentes da ativação do receptor $\alpha 7$, amplamente expresso em neurônios. No entanto, pesquisas recentes mostraram que o PNU-120596 atua inibindo proteínas celulares, como a p-38 MAPK independente do receptor $\alpha 7$. As evidências da atividade do PNU-120596 sobre proteínas celulares geraram questionamentos sobre a possibilidade de interação do PNU-120596 com proteínas envolvidas na memória de medo. A bioinformática, principalmente, a combinação da ciência de redes e *docking* molecular fornecem uma excelente metodologia para a descoberta de proteínas relacionadas à memória de medo passíveis de interação com o PNU-120596. No nosso estudo, utilizou-se técnicas de farmacologia de rede na prospecção de alvos relacionados à memória de medo e ao PNU-120596 em bancos de dados, como o *Genecards*, *Therapeutic Target Database*, *OMIM* e *Pharmmaper* e gerados redes de interações proteína-proteína com os alvos comuns a memória de medo e PNU-120596. Além disso, análises de enriquecimento funcional foram feitas com *Gene ontology* e KEGG. As proteínas com maiores graus nas redes foram então selecionadas para as análises de *docking* molecular, com o PNU-120596 e inibidores padrões utilizados na prática clínica. Descobriu-se que proteínas como AKT1, CREB1 e MTOR foram os três principais alvos relevantes na rede principal. Além disso, uma rede de proteínas quinases, como AKT1, MAPK1, MAPK8 e PI3K foram identificadas como passíveis de interação com o PNU-120596. No *docking* molecular obtivemos energias de ligações

favoráveis ao acoplamento molecular e a similaridade quanto à disposição espacial do PNU-120596 em comparação aos inibidores. Ainda, apresentamos o perfil de comparação da interação entre os resíduos de aminoácidos das proteínas entre o PNU-120596 e os inibidores. Contudo, propôs-se que o PNU-120596 interage por meio de artifícios computacionais com proteínas reguladoras da memória de medo, assumindo um novo papel funcional. Estudos *in vitro* e *in vivo* ainda são necessários para estabelecer como essas possíveis interações podem influenciar a formação de memórias aversivas.

Palavras-chave: Memória de medo; Docking molecular; Bioinformática; Biologia de sistemas; Sistema nervoso.

ABSTRACT

Fear, an emotion triggered in response to danger or threat, is essential for human survival. However, a large part of the population experiences episodes of constant or recurrent fear, accompanied by physical and psychological suffering. Fear memory comprises a cognitive process for processing fear and is dysregulated in some mental disorders, such as anxiety disorders. Existing medications for treating fear-related conditions have several limitations, with the discovery of new therapeutic alternatives being an emergency. PNU-120596 is a positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ acetylcholine receptor developed to study the behavioral changes resulting from the activation of the $\alpha 7$ receptor, widely expressed in neurons. However, recent research has shown that PNU-120596 works by inhibiting cellular proteins such as p-38 MAPK independent of the $\alpha 7$ receptor. The evidence of PNU-120596's activity on cellular proteins raised questions about the possibility of PNU-120596's interaction with proteins involved in fear memory. Bioinformatics, mainly the combination of network science and molecular docking, provides an excellent methodology for discovering proteins related to fear memory capable of interacting with PNU-120596. Our study used network pharmacology techniques to search for targets related to fear memory and PNU-120596 in databases such as Genecards, Therapeutic Target Database, OMIM, and Pharmmaper and generated protein-protein interaction networks, with the common targets being fear memory and PNU-120596. Furthermore, functional enrichment analyses were performed with Gene ontology and KEGG. The proteins with the highest degrees in the networks were then selected for molecular docking analyses, with PNU-120596 and standard inhibitors used in clinical practice. It turned out that proteins such as AKT1, CREB1, and MTOR were the top three relevant targets in the core network. Furthermore, a network of protein kinases, such as AKT1, MAPK1, MAPK8, and PI3K, were identified as capable of interacting with PNU-120596. In molecular docking, we obtained binding energies favorable to molecular coupling and similarity regarding the special arrangement of PNU-120596 compared to inhibitors. Furthermore, we present the comparison profile of the interaction between the amino acid residues of the proteins

between PNU-120596 and the inhibitors. However, it has been proposed that PNU-120596 interacts through computational tricks with fear memory regulatory proteins, assuming a new functional role. In vitro and in vivo studies are still needed to establish how these possible interactions may influence the formation of aversive memories.

Key words: Fear memory; Docking molecular; Bioinformatics; System biology; Nervous system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição global dos transtornos de ansiedade

Figura 2 - Estrutura molecular do PNU-120596 e sítio de interação no receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR)

Figura 3 - Modelo de rede de interação. Rede de interação representando os nós (vermelho) e arestas (linhas pretas)

Figura 4 - Diagrama de Veen com a intersecção entre os alvos relacionados ao PNU-120596 (azul) e a memória de medo (amarelo)

Figura 5 - Representação das redes PPI. Dados PPI gerados pelo Cytoscape 3.9.1, onde quanto maior a intensidade de cor, maior o grau de Degree

Figura 6 – Diagrama de Wayne para os alvos que coincidem. (A) O diagrama de Wayne para o módulo principal. (B) O diagrama de Wayne para o módulo *MTOR* e (C) módulo *CHRNA4*

Figura 7 - Análise de enriquecimento de Ontologia gênica (GO)

Figura 8 - Poses dos ligantes PNU-120596 (amarelo) e os inibidores (azul) no sítio ativo dos alvos proteicos

Figura 9 - Estrutura planar do PNU-120596 com ligações nos aminoácidos das proteínas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos alvos gênicos comuns a memória de medo e ao PNU-120596

Tabela 2 - Pontuações dos alvos principais do PNU-120596 (módulo principal)

Tabela 3 - Pontuações dos alvos principais do PNU-120596 no módulo mTOR usando o MCODE

Tabela 4 - Pontuações dos alvos principais do PNU-120596 no módulo *CHRNA4* usando o MCODE

Tabela 5 - Sumário da análise de enriquecimento pelo DisGeNET

Tabela 6 - Afinidade de ligação por docking molecular entre o PNU-120596 e os alvos na memória de medo

Tabela 7 - Mapeamento das interações do PNU-120596 com os aminoácidos dos alvos proteicos na memória de medo

Tabela 8 - Mapeamento das interações moleculares de inibidores aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) e as proteínas quinases alvos na memória de medo usando o sítio de ligação onde houve o docking do PNU-120596 nos alvos

Tabela 9 - Interações moleculares comuns ao PNU-120596 e aos inibidores nos alvos proteicos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA	Food and Drug Administration
$\alpha 7$ nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$
MAPs	Moduladores alostéricos positivo
GO	Ontologia gênica
KEGG	Enriquecimento funcional (do inglês, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
PPI	Interações proteína-proteína
FDR	Faixa de corte
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. A memória de medo	15
2.2. Transtornos psiquiátricos com desregulações na memória de medo	16
2.3. Proteínas envolvidas na memória de medo	18
2.4. Moduladores alostéricos positivos (MAPs)	19
2.4.1. O PNU-120596	19
2.5. Farmacologia de Rede	21
2.6. Simulações computacionais no estudo de novas drogas	23
2.6.1. Biologia computacional	23
2.6.2. Docking molecular	24
3. OBJETIVO	25
3.1. OBJETIVO GERAL	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. METODOLOGIA	26
4.1. Triagem e obtenção dos alvos moleculares relacionados à memória de medo	26
4.2. Predição dos alvos gênicos do PNU-120596	26
4.3. Redes de interações Proteína-proteína (PPI)	27
4.4. Análises de enriquecimento funcional GO e KEGG	27
4.5. Simulações de Docking molecular	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Triagem dos alvos para a memória de medo	28
5.2. Predição dos alvos moleculares do PNU-120596	28
5.3. Construção da rede de interação PPI do PNU-120596 na memória de medo	32
5.4. Enriquecimento funcional por Ontologia gênica (GO) e análises de vias (KEGG)	36
5.5. Docking molecular do PNU-120596 nos alvos da memória de medo	40
5.6. DISCUSSÃO	50
5.7. CONCLUSÃO	54
5.8. REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

O medo, emoção desencadeada em resposta ao perigo ou ameaça, é essencial para a sobrevivência humana (TERRANOVA *et al.*, 2022). Os transtornos relacionados ao medo, como transtornos de pânico, fobias específicas e transtornos de estresse pós-traumático são caracterizados por respostas patológicas de medo exacerbado resultantes da exposição a eventos traumáticos fortes e evocadores de medo (PAVLOV *et al.*, 2022). No estado consciente, o medo compreende componentes associativos e não associativos causados pela exposição a ameaças reais ou imaginárias. Indivíduos com transtornos de ansiedade e transtornos de estresse pós-traumático têm dificuldades em distinguir suas experiências traumáticas devido a problemas na extinção da memória devido a respostas de medo (PARK *et al.*, 2022).

O medo, enquanto mecanismo de sobrevivência, envia sinais ao nosso corpo para iniciar respostas de luta ou fuga diante do perigo. Porém, o aprendizado excessivo ou mal adaptativo do medo, além da supergeneralização, leva ao desenvolvimento de psicopatologias. A formação da memória de medo ocorre via estímulos contextuais no hipocampo e na amígdala, via estímulos emocionais relacionados à formação do traço de memória (IZQUIERDO *et al.*, 2016). O processo cognitivo envolvido no processamento do medo é crucial, sabendo que o medo causa memórias duradouras e aversivas (PARK *et al.*, 2022).

O PNU-120596 é um modulador alostérico positivo clássico do receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR) usado para investigar o efeito da ativação de $\alpha 7$ nAChR em diferentes padrões comportamentais. O PNU-120596 é capaz de aumentar o fluxo de cálcio pelo receptor colinérgico e assim, levar a estimulação de vias colinérgicas (HURST *et al.*, 2005). Os moduladores alostéricos positivos do $\alpha 7$ nAChR são fármacos estudados para análise de atividade cognitiva, onde estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram sua eficácia (SZABO *et al.*, 2014). Contudo, recentes estudos mostraram que o PNU-120596, embora sendo seletivo ao receptor $\alpha 7$, possui ação inibitória sobre outras proteínas que independem da ativação do $\alpha 7$ nAChR (WADA *et al.*, 2020).

A exemplo disso está o papel inibitório do PNU-120596 na atividade de proteínas como a p38 MAPK (WADA *et al.*, 2020). Porém, muitas outras proteínas podem também ser alvo do PNU-120596 e ampliar a sua potencialidade farmacológica para o tratamento de outras doenças, como as relacionadas à memória de medo. Assim, o presente estudo

visa fornecer mecanismos subjacentes da interação do PNU-120596 com proteínas que regulam a memória de medo.

Neste estudo, a ciência de rede foi aplicada com o objetivo de identificar proteínas relacionadas à formação de memórias de medo que interagem com o PNU-120596. A farmacologia de rede, como uma nova abordagem analítica, tem sido amplamente utilizada para prever a ação farmacológica e o mecanismo potencial de drogas que atuam no sistema nervoso (SUN et al., 2021). As interações moleculares do PNU-120596 e seus possíveis alvos foram previstas por docking molecular. Além disso, traçamos comparativos de ligação entre os aminoácidos dos alvos proteicos com o PNU-120596 e inibidores padrão amplamente utilizados pela comunidade médica. O estudo visa elucidar outros alvos moleculares do PNU-120596 que não o $\alpha 7$ nAChR, a fim de mapear possíveis interações em redes de proteínas que regulam a memória de medo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A memória de medo

A memória pode ser definida como a retenção de representações internas adquiridas ao longo do tempo que requer experiência e a capacidade de reconstruir essas representações em momentos posteriores. O medo é uma emoção humana distinguível de todas as outras e facilmente reconhecida. Embora importante para a sobrevivência, grande parte da população experimenta episódios de medo constante ou recorrente, acompanhados de sofrimentos físicos e psicológicos. A ansiedade e o estresse são exemplos relacionados ao medo e diferentes classes de psicofármacos são utilizados para o manejo de transtornos psiquiátricos (IZQUIERDO *et al.*, 2016).

O termo medo compreende um estado de sentimentos subjetivos, comportamentais e fisiológicos que ocorrem em respostas a situações ameaçadoras (JOHANSEN *et al.*, 2011). O condicionamento do medo pavloviano surgiu como um paradigma central no estudo das bases neurobiológicas da memória de medo. O condicionamento envolve a formação de memória aversiva através de associação entre estímulos relacionados ao contexto (contextual) e a estímulos desencadeantes do medo, conhecidos como incondicionados (MCSWEENET AND MURPHY, 2014).

Os transtornos relacionados ao medo, como transtornos de pânico, fobias específicas e transtornos de estresse pós-traumático, são caracterizados por respostas

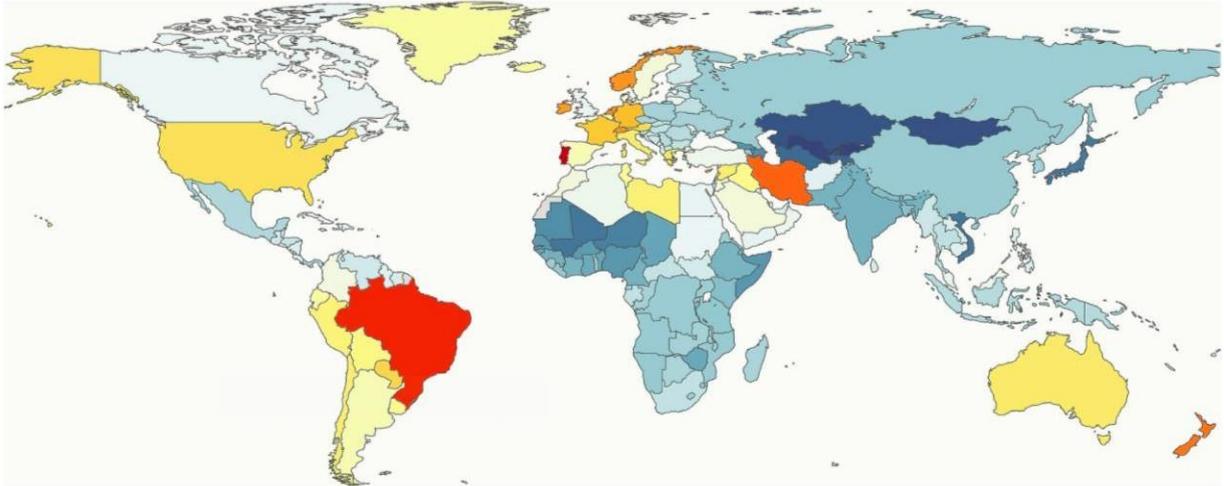
patológicas de medo exacerbado resultantes da exposição a eventos traumáticos fortes e evocadores de medo (PAVLOV *et al.*, 2022).

2.2. Transtornos psiquiátricos com desregulações na memória de medo

Os transtornos de ansiedade estão relacionados a respostas generalizadas a estímulos e situações ameaçadoras. Diferentes manifestações clínicas dos transtornos de ansiedade ocorrem, uma vez que podem estar relacionados a estímulos específicos, como as fobias, e outros indivíduos podem experimentar ataques abruptos e inesperados de pânico (KYRIAKOULIS AND KYRIOS, 2023). O transtorno de pânico é caracterizado por sofrimento episódico grave, com ativação de regiões cerebrais reguladoras do medo, onde essas experiências são percebidas como ameaças no córtex pré-frontal e na amígdala, desencadeando estímulos nervosos de luta ou fuga. Os sinais físicos manifestam-se de forma psicofisiológica como tonturas, tremores, aumento da frequência respiratória e cardíaca (KIM, 2019).

A epidemiologia da doença é essencial para entender as dinâmicas populacionais, bem como estimar os níveis de estresse e transtornos psiquiátricos em determinadas populações. Segundo os dados epidemiológicos avaliados por JAVAID *et al.*, 2023 e usando as métricas de saúde de dados do *Global Burden of disease*, a prevalência global de transtornos ansiosos com associação ao medo em 2019 foi de 4,05%, com aumento substancial no número de casos entre 1990 e 2019 (194,9 milhões para 301,4 milhões no mundo) (Figura 1). Além disso, as mulheres são mais propensas a desenvolverem transtornos de ansiedade do que os homens. Na América Latina, bem como no Caribe e nos países com alta renda na América do Norte apresentam maiores taxas no desenvolvimento dos transtornos, onde o Brasil apresenta uma prevalência de 8.600 casos por 100.000 habitantes.

Figura 1 – Distribuição global dos transtornos de ansiedade. As cores representam a taxa de prevalência de transtornos de ansiedade, em ordem decrescente, do vermelho escuro (8.600 casos por 100.000), laranja, amarelo, azul claro e tons de azul escuro (2.000 casos por 100.000).



Fonte: Adaptado de JAVAID *et al.*, 2023

Outro importante transtorno psiquiátrico com a memória de medo desregulada e respostas ao medo exacerbadas é o transtorno do estresse pós-traumático, incluído nos transtornos de ansiedade. A prevalência de eventos traumáticos na vida dos indivíduos varia de 61% a 80%, onde aproximadamente 5% a 10% da população o transtorno do estresse pós-traumático é instalado (WANG *et al.*, 2021). O transtorno do estresse pós-traumático é uma condição psiquiátrica incapacitante desenvolvida após momentos estressantes e traumáticos na vida.

O transtorno do estresse pós-traumático é uma condição psiquiátrica debilitante, caracterizada pelo desenvolvimento de sintomas intrusivos, fuga de pistas associativas relacionadas aos traumas, além de alterações negativas sobre o humor e cognição (MERIANS *et al.*, 2023). O desenvolvimento do transtorno do estresse pós-traumático é multifatorial, envolvendo tanto relações ambientais quanto gênicas (JOVANOVIC *et al.*, 2012). Além disso, a história pessoal passada, incluindo os eventos traumáticos ocorridos durante a infância e até mesmo na vida adulta podem e influenciam a regulação do medo e das emoções (KOENEN *et al.*, 2005; DUNCAN *et al.*, 2017; RESSLER *et al.*, 2022).

Os medicamentos existentes para o tratamento de memórias traumáticas possuem inúmeras limitações e baixa eficácia. Desta forma, a descoberta de novas alternativas, é então, imperativo.

2.3. Proteínas envolvidas na memória de medo

As proteínas desempenham um papel fundamental na memória de medo, sendo um componente importante na formação da memória por meio dos processos de síntese proteica, pois promovem modificações neuro estruturais. Etapas importantes no processamento do medo, como a consolidação da memória acontecem pela ativação de redes complexas de neurônios no cérebro, e as proteínas desempenham um papel vital nessa ativação.

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) são particularmente importantes na formação da memória de medo. A MAPK é uma enzima que desempenha um papel central na sinalização celular e é ativada por experiências traumáticas desencadeadoras de medo. As proteínas MAPK quando ativadas ajudam na estabilização de conexões sinápticas na memória de medo. Quando um evento evocador de medo ocorre, como por exemplo um choque elétrico em experimentos com roedores, a MAPK é ativada em áreas cerebrais específicas, como hipocampo e amígdala (SCHAFE et al., 2000).

Ainda o CREB1, outra importante proteína atua como fator de transcrição gênica específica regulando a expressão de genes codificadores de proteínas na memória de medo. Dentre tais genes, muitos deles estão envolvidos no processo de plasticidade sináptica (BOURTCHULADZE et al., 1994). Além disso, pesquisadores observaram a relação do CREB1 com a memória de longo prazo no condicionamento de medo, uma vez que na amígdala o aumento nos níveis de CREB1 causam o aumento significativo da memória de longo prazo na memória de medo (JOSSELYN et al., 2001).

Outra importante classe de proteínas, como as proteínas quinases atuam na consolidação e formação da memória de medo. As proteínas quinases compõem o grupo de enzimas catalisadoras de reações bioquímicas. Durante a experiência de medo, na consolidação da memória de medo, auxilia na estabilização das mudanças sinápticas, contribuindo para o fortalecimento das conexões relacionadas à memória de medo

(SCHAFE et al., 2001). A ativação contínua de proteínas quinases, são necessárias para sustentar e preservar a memória de medo de longo prazo (SCHAFE et al., 2001).

O conhecimento acerca das proteínas envolvidas na biologia da memória de medo é crucial para a síntese e avaliação de novas moléculas com potencial de interação. Tais proteínas regulam vias bioquímicas necessárias para a formação da memória de medo, que por tanto, torna-se possíveis alvos na terapia farmacológica em transtornos associados ao medo, por exemplo.

2.4. Moduladores alostéricos positivos (MAPs)

Os moduladores alostéricos positivos (MAPs) potencializam a resposta a receptores mediadas por agonistas, sendo ligantes em um alvo biológico. Ainda, um MAP pode impedir a ligação da molécula natural por causar uma mudança conformacional em sua estrutura. Da mesma forma, no caso das enzimas, em que um MAP pode aumentar, diminuir ou inibir a atividade catalítica (WESTEN, GAULTON AND OVERINGTON *et al.*, 2014).

Adicionalmente, os moduladores alostéricos apresentam uma perspectiva intrigante do ponto de vista fisiológico, proporcionando um meio para ajustar a regulação natural (intensificando uma resposta regulada naturalmente) ao invés de simplesmente bloquear ou ativar de forma constante as proteínas. O impacto desses compostos no organismo não se restringe apenas à dosagem, podendo também ser influenciado pela concentração e pela interação com os sinais fisiológicos e os circuitos de retroalimentação (SOUDIJIN, WIJNGAARDEN AND IJZERMAN *et al.*, 2004).

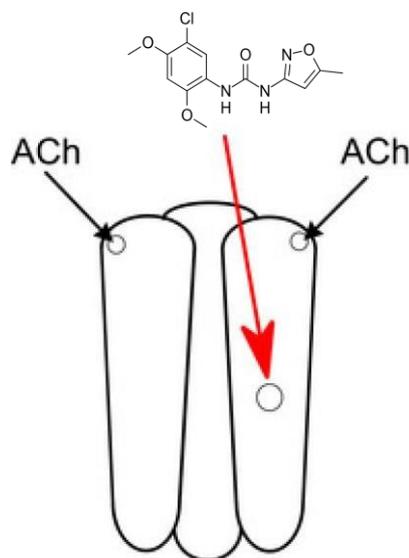
O PNU-120596, por exemplo, é um modulador alostérico positivo do $\alpha 7$ nAChR inicialmente proposto com ação seletiva ao $\alpha 7$ nAChR, sem alterações detectadas em outros receptores colinérgicos. Proposto como molécula sintética com potencial para tratar distúrbios psiquiátricos e neurológicos por meio do receptor $\alpha 7$ (HUST et al., 2005). Atualmente, é clara a atuação do PNU-120596 sobre o receptor de acetilcolina, contudo deve-se levar em consideração os possíveis efeitos da sua aplicação sobre outros sistemas celulares, como proteínas plasmáticas, por exemplo.

2.4.1. O PNU-120596

O PNU-120596 (1-5(-cloro-2,4-dimetoxi-fenil)-3-(5-metil-isoxanol-3-yl)-ureia é um MAP do $\alpha 7$ nAChR usado para investigar o efeito da ativação do $\alpha 7$ nAChR em várias modificações neurocomportamentais, como na redução de comportamentos depressivos em camundongo (Figura 2) (ALZAREA AND RAHMAN, 2018). Estudos mostram que a administração de PNU-120596 melhora as disfunções motoras (GOWAYED *et al.*, 2022) em ratos e reverte déficits cognitivos (MCLEAN *et al.*, 2011). O PNU-120596 aumenta o fluxo de cálcio evocado por agonistas no $\alpha 7$ nAChR humano (HURST *et al.*, 2005). Além disso, o PNU-120596 é capaz de aumentar e prolongar a resposta mediada pelo $\alpha 7$ nAChR em neurônios hipocampais e corticais (VULFIUS *et al.*, 2020). Alguns MAPs do $\alpha 7$ nAChR são drogas pró-cognitivas com vários estudos pré-clínicos e clínicos demonstrando sua eficácia (SZABO *et al.*, 2014).

Embora a comunidade científica tenha por muitos anos avaliado as repercussões cognitivas e comportamentais do PNU-120596 frente a ativação do $\alpha 7$ nAChR, pesquisas recentes mostram influências diretas do PNU-120596 sobre algumas proteínas plasmáticas. Os estudos recentes mostraram seu papel inibitório na atividade de proteínas reguladoras como a p38 MAPK independente de $\alpha 7$ nAChR, o que levanta questionamentos sobre o potencial de interação entre o PNU-120596 e outras proteínas celulares (WADA *et al.*, 2020).

Figura 2 - Estrutura molecular do PNU-120596 e sítio de interação no receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$ ($\alpha 7$ nAChR).



Fonte: Adaptado de VULFIUS *et al.*, 2020

O PNU-120596 em estudos anteriores demonstrou potenciais efeitos terapêuticos promissores encontrados na diminuição do comportamento do tipo depressivo de camundongos e após lesão cerebral traumática (ALZAREA AND RAHMAN, 2018; GAIDHANI AND UTESHEV, 2018).

As avaliações científicas relacionadas ao PNU-120596 têm atribuído majoritariamente os efeitos do PNU-120596 sobre o $\alpha 7$ nAChR, até mesmo sobre os benefícios no processo de memória, como descrito por CALLAHAN *et al.*, 2013. É notório a atuação do PNU-120596 na interação com proteínas celulares e com o caráter de melhoria sobre os aspectos de memória. Assim, propõem-se aqui, investigar possíveis interações de PNU-120596 com proteínas relacionadas à memória de medo, utilizando ferramentas computacionais.

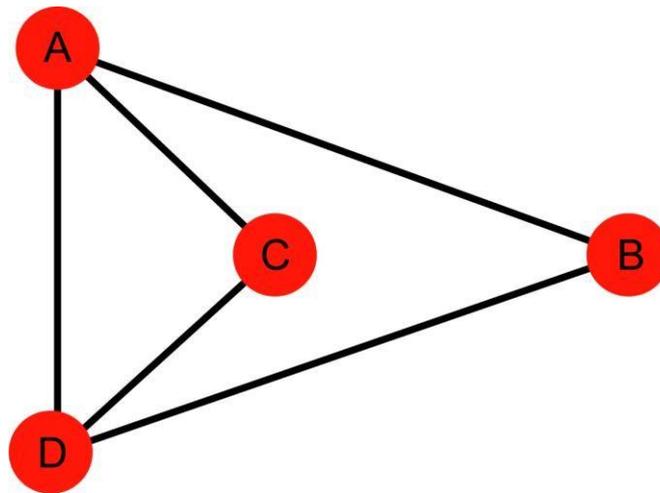
2.5. Farmacologia de Rede

A farmacologia de rede como uma nova abordagem analítica tem sido amplamente utilizada para prever a ação farmacológica e o mecanismo potencial de drogas que atuam no sistema nervoso. Além disso, é capaz de incluir as bases comportamentais e neuroquímicas do cérebro, por meio da integração de alvos de drogas, doenças e seus alvos em redes de biomoléculas (SUN *et al.*, 2021). Atualmente, a farmacologia de rede tem evoluído e está sendo utilizada no desenvolvimento de novos medicamentos por integrar a medicina sistemática e a ciência da informação. A farmacologia de rede é uma abordagem *in silico* que estabelece uma rede de “proteínas-compostos/doenças-genes” para revelar sinergismos entre novos medicamentos e medicamentos atuais (NOOR *et al.*, 2022).

Considerando a hipótese de interação entre elementos de um sistema, a abordagem conhecida como Biologia de sistemas emergiu com o propósito de compreender sistemas complexos no contexto da biologia. Guiada pelos princípios da teoria geral de sistemas, sua meta consiste em investigar e decifrar a organização de fenômenos por meio dos princípios compartilhados por componentes específicos que participam desses fenômenos (ZOU; LAUBICHLER, 2018; IDEKER; GALITSKI; HOOD, 2001). No processo de integração, a biologia de sistemas emprega estratégias como a construção de redes de interação (POLONI *et al.*, 2014). Essas redes, também conhecidas como redes ou sistemas, são compostas por nós (pontos) e conexões (arestas) (Figura 3). Elas são elaboradas seguindo os princípios básicos da teoria dos

grafos. Com base nesse enfoque teórico, as redes podem conter conexões unidirecionais (redes direcionadas) ou conexões bidirecionais (redes não direcionadas).

Figura 3 – Modelo de rede de interação. Rede de interação representando os nós (vermelho) e arestas (linhas pretas).



Fonte: O autor, 2023

A estrutura de uma rede pode variar em vários formatos, sendo a escolha determinada pela análise que será conduzida (POLONI *et al.*, 2014). Esses conceitos matemáticos representam uma espécie de "estrutura", onde os dados biológicos resultantes de técnicas experimentais são moldados em uma configuração de rede (KITANO, 2002a; KITANO, 2002b).

Na análise de redes de interação, características referentes a topologia auxiliam no entendimento da representação gráfica e estatística do *network*. Além disso, outras informações são relevantes e necessárias para as análises, como a quantidade de nós conectados a outros nós, com um grande ou pequeno volume de conexões. Os *hubs* são os nós com uma alta densidade de conexões. *Betweenness* e *closeness* estão relacionados ao número de caminhos que passam por um nó e a menor distância entre esses caminhos, respectivamente. O diâmetro da rede corresponde a distância entre os nós mais distantes da rede e por fim, a centralidade de conectores é baseada em cálculos de propriedades, como o *betweenness* servindo para analisar quais são os *hubs* com maior relevância na rede (POLONI *et al.*, 2014).

A aplicação das ciências de rede por meio das redes complexas é uma ferramenta usada por diferentes áreas da biologia com o intuito de mapear redes de interações entre proteínas e compostos, naturais ou sintéticos. Sendo, o estudo das redes biológicas fundamental para o desenvolvimento de novas drogas candidatas a medicamentos e até mesmo o reposicionamento dos fármacos existentes. Nesse estudo, usamos a ciência de redes como ferramenta para mapear computacionalmente por meio de conceitos matemáticos as proteínas com maiores graus de complexidade e interação dentro das redes biológicas formadas. Assim, desvendando as proteínas *hub* dentro do circuito da memória de medo e do PNU-120596.

A biologia computacional no estudo das redes biológicas garante o aporte de ferramentas necessárias para a previsibilidade dessas interações intermoleculares. Além disso, redes de interações proteína-proteína torna viável o estudo detalhado dessas interações, a fim de presumir quais modificações metabólicas e fisiológicas podem ocorrer a partir dessas interações. Dentro dos paradigmas moleculares da memória de medo, é importante o uso das ferramentas computacionais e a aplicação de redes biológicas e farmacologia de rede principalmente na elaboração de novas drogas com ações diretas sobre esse sistema de memória. Além disso, o estudo de redes biológicas no desenvolvimento de novos medicamentos conjugados a simulações computacionais de docking molecular possibilita conhecer as inúmeras possíveis interações de uma droga com diferentes alvos biológicos em diferentes vias de regulação bioquímica.

2.6. Simulações computacionais no estudo de novas drogas

2.6.1. Biologia computacional

Por volta da década de 1960, o progresso científico simultâneo nas áreas de ciência da computação e biologia molecular possibilitou a incorporação de técnicas de informática na criação de bancos de dados contendo sequências de proteínas. Esse acontecimento marcou a origem de um novo campo de estudo que veio a ser chamado de bioinformática (GAUTHIER *et al.*, 2019).

A expressão "*in silico*" é utilizada para descrever investigações que se baseiam em modelagem ou simulação computacional (VICECONTI *et al.*, 2020). Nos dias de hoje, a bioinformática desempenha um papel fundamental no processamento de dados provenientes de sequenciamento de nova geração e na realização de estudos

farmacológicos *in silico*, devido à vasta quantidade de informações geradas nas pesquisas nessas áreas. No contexto da bioinformática estrutural, assim como em outras subáreas da bioinformática, o foco reside no desenvolvimento de abordagens para explorar a estrutura de macromoléculas biológicas. Desde o momento em que a primeira estrutura proteica foi elucidada por meio da cristalografia de raios-X, a relação entre a conformação tridimensional das proteínas e fatores patológicos têm sido tema de inúmeros estudos.

Nesse contexto, as investigações em bioinformática estrutural, que envolvem métodos como o docking molecular (análise das interações com moléculas) e a modelagem molecular (criação de estruturas ainda não esclarecidas), revelam-se de extrema importância no desenvolvimento de candidatos a novos medicamentos (BOURNE & WEISSIG, 2003).

2.6.2. Docking molecular

Entre as abordagens computacionais *in silico* mais amplamente aplicadas, o docking molecular tem ganhado destaque como uma ferramenta crucial nos estudos farmacológicos (PINZI & RASTELLI, 2019). De maneira geral, o docking molecular consiste em uma simulação computacional que simula a ancoragem de um ligante a uma macromolécula, frequentemente uma proteína, visando prever a afinidade entre eles (DIAS & AZEVEDO, 2018). Utilizando como base o conceito de chave e fechadura para determinar a conformação e a orientação do ligante em relação à proteína, o docking molecular possibilita a análise das interações moleculares nesse complexo (TRIPATHI & BANKAITIS, 2017). Para além da descoberta de novos compostos com potencial terapêutico, essa abordagem é amplamente empregada na previsão de interações ligante-receptor em nível molecular e na exploração de relações de estrutura-atividade por meio de simulações *in silico* (PINZI & RASTELLI, 2019).

O processo de docking molecular pode ser dividido em duas etapas principais: avaliação da pontuação e seleção do algoritmo de busca. A avaliação da pontuação tem como objetivo determinar o valor das poses do ligante com base nas interações moleculares estabelecidas no complexo proteína-ligante, e essa pontuação pode variar conforme o software utilizado. As pontuações mais favoráveis obtidas pelo processo de docking indicam a conformação mais estável na interação com o receptor (COUTINHO & KALINE, 2007).

Quanto ao algoritmo de busca, esse aspecto diz respeito à maneira como diferentes conformações e orientações do ligante no sítio de ligação do receptor são exploradas. Uma variedade de algoritmos está disponível, destacando-se os métodos de busca estocástica, que envolvem a randomização das conformações do ligante para criar um conjunto diversificado de conformações para análise (MENG *et al.*, 2011). O algoritmo genético, um dos métodos estocásticos mais proeminentes, utiliza princípios da teoria da evolução de Darwin para gerar amostras com várias conformações e orientações de ligação (MENG *et al.*, 2011).

Programas como AutoDock Vina utiliza algoritmos genéticos, com diferenças nas funções de pontuação que não só determinam os resultados, mas também categorizam quais poses são selecionadas para "permutação genética" (TROTT *et al.*, 2010; JONES *et al.*, 1997). Além das abordagens de busca estocástica, o docking molecular também pode ser categorizado com base na flexibilidade ou rigidez do ligante durante a fase de randomização. Um ligante rígido, apesar de limitar a precisão dos resultados e o número de possíveis ancoragens à proteína, permite a ancoragem em conformações específicas, muitas vezes predefinidas pela molécula para examinar interações específicas com a macromolécula (MENG *et al.*, 2011).

No presente estudo, as proteínas relacionadas à memória de medo foram mapeadas computacionalmente, bem como as proteínas possivelmente comuns de interação com o PNU-120596. Dessa forma, pretende-se explorar possíveis congruências entre os alvos da memória de medo e do PNU-120596 tornando conhecido a comunidade científica e médica novos mecanismos de sua atuação sobre a memória.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Mapear as interações moleculares relacionadas ao PNU-12059 e proteínas envolvidas no processo de consolidação de memórias de medo, utilizando análises computacionais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Predizer as proteínas alvos do PNU-120596 e proteínas envolvidas na memória

de medo;

- b) Construir redes de interação entre os alvos gênicos das proteínas envolvidas na memória de medo, analisar a ontologia gênica (GO, do inglês *gene ontology*) e enriquecimento funcional (KEGG, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) destas moléculas;
- c) Simular computacionalmente por meio de docking molecular as interações do PNU-120596 com os alvos protéicos encontrados nas predições e comparar com inibidores específicos comercialmente usados.

4. METODOLOGIA

4.1. Triagem e obtenção dos alvos moleculares relacionados à memória de medo

A prospecção de alvos ocorreu em cinco bancos de dados públicos usando o descritor "*Fear memory*", como palavra-chave no *GeneCards* (<https://www.genecards.org/>) *Therapeutic Target Database* (TTD, <https://db.idrblab.net/ttd/>) e *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM, <https://omim.org/>). Todos os alvos foram filtrados para o organismo "*Homo sapiens*". Alvos repetidos foram excluídos e um banco de dados de alvos envolvidos na memória de medo foram obtidas.

4.2. Predição dos alvos gênicos do PNU-120596

A estrutura bidimensional (2D) do PNU-120596 (CID: 311434) foram obtidas no banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os alvos moleculares previstos usando o banco de dados *SwissTargetPrediction* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), o servidor *PharmMapper* (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) e *GeneCards* (<https://www.genecards.org/>). Os alvos previstos foram introduzidos no banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>), filtrado definindo a espécie como *Homo sapiens* e combinado os alvos em *GeneCards* para construir a biblioteca de alvos potenciais do PNU-120596.

4.3. Redes de interações Proteína-proteína (PPI)

A fim de investigar possíveis interações entre alvos interseccionais do PNU-120596 e memória de medo, os alvos comuns ao PNU-120596 e ao descritor “*Fear memory*” foi gerado usando VENNY 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). O STRING 11.5 (<https://string-db.org/>) foi utilizado para construir um diagrama de rede proteína-proteína (PPI) para os alvos comuns do PNU-120596 e memória de medo com espécies como “*Homo sapiens*” e limite mínimo de interação definido com Confiança Média > 0,4. Os dados obtidos do banco de dados String foram inseridos no Cytoscape 3.9.1 para visualizar a rede de interações proteína-proteína (PPI, do inglês *protein-protein interaction*). Os módulos densamente conectados na rede foram identificados usando o plugin Molecular Complex Detection (MCODE) (BADER AND HOGUE, 2003) com os parâmetros padrão (“Degree Cutoff = 2”, “Node Score Cutoff = 0.2,” “K-Core = 2” e “Profundidade máxima = 100”). Os genes *hub* foram recuperados por MCC, DMNC, Degree, Closeness e Betweenness usando o plugin cytoHubba (CHIN *et al.*, 2014).

4.4. Análises de enriquecimento funcional GO e KEGG

A ferramenta online ShinyGO v0.77 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) foi utilizada para a análise de enriquecimento *Gene Ontology* (GO) e KEGG de alvos comuns entre o PNU-120596 e memória de medo. Além disso, o Metascape foi usado para obter o resumo da análise de enriquecimento em DisGenET, e os resultados foram organizados de acordo com os valores - Log₁₀ (P). As espécies biológicas foram definidas como *Homo sapiens*. Para isso, a lista de genes consenso foi importada no servidor ShinyGO e enviadas para análises. A faixa de corte (FDR) foi definida em 0.05 para as previsões. O ShinyGO calcula o FDR com base no valor *p* nominal do teste hipergeométrico.

4.5. Simulações de Docking molecular

A conformação das proteínas alvos foi pesquisada no banco de dados PDB (<https://www.rcsb.org>). Para identificar o sítio de ligação que utilizados para o docking molecular, realizamos uma análise com o software GRASP, um programa baseado em aprendizado de máquina que busca sítios de ligação calculando a acessibilidade

dos resíduos ao solvente, características físico-químicas e interações estabelecidas (SANTANA *et al.*, 2020). Os testes de docking molecular foram realizados no software Autodock Vina, e o ajuste de seus respectivos parâmetros, como remoção de água, adição de hidrogênios polares e carga de Kollman no Autodock tools 1.5.7 (TROT AND OLSON *et al.*, 2010). Todas as moléculas de água foram removidas do meio, hidrogênios polares foram adicionados aos aminoácidos e as cargas de Kollman adicionadas às proteínas. As interações moleculares entre os ligantes e os aminoácidos foram demonstradas e analisadas usando o visualizador BIOVIA Discovery Studio (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>).

5. RESULTADOS

5.1. Triagem dos alvos para a memória de medo

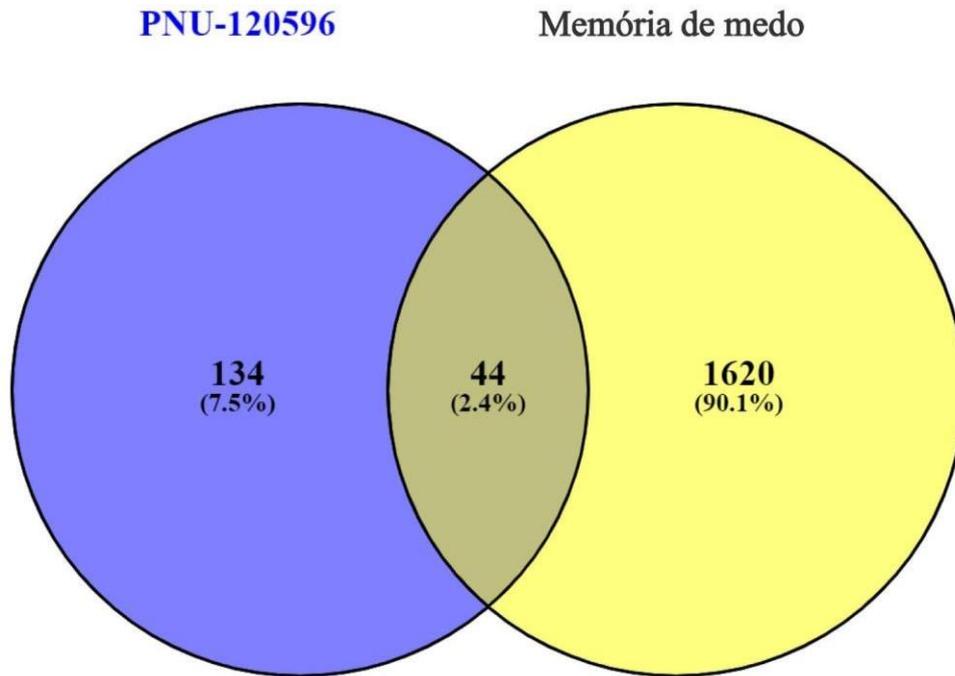
Um total de 1.844 alvos para a memória de medo foram recuperados dos bancos de dados *GeneCards*, TTD e OMIM usando o seguinte descritor: “*Fear memory*”. Os genes obtidos no *GeneCards* foram considerados de acordo com o Relevance Score (≥ 1), e os genes abaixo do valor de corte foram removidos. Portanto, 1.660 genes do *GeneCards* foram incluídos na análise. O OMIM apresentou 20 resultados, e as réplicas foram removidas, gerando um arquivo final com um total de 1.664 genes alvo. Nenhum resultado foi encontrado no banco de dados TTD. O valor máximo da pontuação obtida no *GeneCards* foi de 34,30 e o valor mínimo de 0,24. Conforme mostrado na Tabela 1, 44 (2,4%) alvos comuns do PNU-120596-memória de medo foram obtidos via intersecção, e o diagrama de Venny foi gerado usando VENNY 2.1.0, conforme mostrado na Figura 6.

5.2. Predição dos alvos moleculares do PNU-120596

Os alvos previstos e obtidos do *SwissTargetPrediction*, *PharmMapper Server* e *GeneCards* foram 100, 299 e 12, respectivamente. No UniProt, foram refinados selecionando os alvos da espécie *Homo sapiens*, onde apenas 67 dos 299 genes do servidor *PharmMapper* eram de humanos e foram considerados para as análises. Após a remoção dos alvos repetidos, foram obtidos 178 alvos finais do PNU-120596.

Figura 4 - Diagrama de Veen com a intersecção entre os alvos relacionados ao PNU-

120596 (azul) e a memória de medo (amarelo).



Fonte: O Autor, 2023

Tabela 1 - Lista dos alvos gênicos comuns à memória de medo e ao PNU-120596.

Genes	Unipro ID	ChEMBL ID	Alvos
<i>CHRNA7</i>	P36544	CHEMBL2492	Subunidade alpha-7 neuronal do receptor de Acetilcolina
<i>FLT1</i>	P17948	CHEMBL1868	Receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular
<i>IMPDH2</i>	P12268	CHEMBL2111369	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase 2
<i>RAF1</i>	P04049	CHEMBL1906	RAF proto-oncogene serina/treonina-proteína quinase
<i>FLT4</i>	P35916	CHEMBL1905	Receptor 3 do fator de crescimento endotelial vascular
<i>EPHB2</i>	P29323	CHEMBL3290	Receptor 2 de efrina tipo B

<i>RIPK2</i>	O43353	CHEMBL5014	Serina/treonina-proteína quinase 2 que interage com o receptor
<i>MAPK8</i>	P45983	CHEMBL2276	Proteína quinase 8 ativada por mitógeno
<i>MAPK10</i>	P53779	CHEMBL2637	Proteína quinase 10 ativada por mitógeno
<i>CREBBP</i>	Q92793	CHEMBL5747	Proteína de ligação a CREB
<i>EIF4H</i>	Q15056	CHEMBL1293274	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4H
<i>ADORA2A</i>	P29274	CHEMBL251	Receptor de adenosina A2a
<i>ADORA1</i>	P30542	CHEMBL226	Receptor de adenosina A1
<i>GRM5</i>	P41594	CHEMBL3227	Receptor metabotrópico de glutamato 5
<i>AGTR1</i>	P30556	CHEMBL227	Receptor de angiotensina II tipo 1
<i>SCN9A</i>	Q15858	CHEMBL4296	Proteína do canal de sódio tipo 9 subunidade alfa
<i>EDNRA</i>	P25101	CHEMBL252	Receptor de endotelina-1
<i>MAPK1</i>	P28482	CHEMBL4040	Proteína quinase 1 ativada por mitógeno
<i>IRAK4</i>	Q9NWZ3	CHEMBL4523710	Quinase 4 associada ao receptor de interleucina-1
<i>EIF2AK1</i>	Q9BQI3	CHEMBL6029	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2-alfa quinase 1
<i>PIK3CA</i>	P42336	CHEMBL4005	Isoforma alfa da subunidade catalítica de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-quinase
<i>GRM4</i>	Q14833	CHEMBL2736	Receptor metabotrópico de glutamato 4
<i>RPS6KB1</i>	P23443	CHEMBL4501	Proteína ribossômica S6 quinase beta-1
<i>MPO</i>	P05164	CHEMBL2439	Mieloperoxidase
<i>HDAC1</i>	Q13547	CHEMBL325	Histona desacetilase 1

<i>HIF1A</i>	Q16665	CHEMBL4261	Fator 1-alfa induzível por hipóxia
<i>PTGS1</i>	P23219	CHEMBL221	Prostaglandina G/H sintase 1
<i>CXCL8</i>	P10145	CHEMBL2157	Interleucina-8
<i>ACHE</i>	P22303	CHEMBL220	Acetilcolinesterase
<i>MAOA</i>	P21397	CHEMBL1951	Amina oxidase [contendo flavina] A
<i>PDE10A</i>	Q9Y233	CHEMBL4409	cAMP e cGMP 3',5'-fosfodiesterase cíclica 10A inibida por cAMP
<i>GABRA5</i>	P31644	CHEMBL5112	Subunidade alfa-5 do receptor de ácido gama-aminobutírico
<i>KCNH2</i>	Q12809	CHEMBL240	Subfamília de canal dependente de voltagem de potássio, membro 2
<i>MTOR</i>	P42345	CHEMBL2842	Serina/treonina-proteína quinase mTOR
<i>GRM1</i>	Q13255	CHEMBL3772	Receptor metabotrópico de glutamato 1
<i>AKT1</i>	P31749	CHEMBL4282	RAC-alfa serina/treonina-proteína quinase
<i>DYRK1A</i>	Q13627	CHEMBL2292	Quinase 1A regulada por tirosina-fosforilação de especificidade dupla
<i>CHRNA4</i>	P43681	CHEMBL1882	Subunidade alfa-4 do receptor neuronal de acetilcolina
<i>CHRNB2</i>	P17787	CHEMBL1883	Subunidade beta-2 do receptor neuronal de acetilcolina
<i>CHRNB4</i>	P30926	CHEMBL2109230	Subunidade beta-4 do receptor neuronal de acetilcolina
<i>CREB1</i>	P16220	CHEMBL5587	Proteína 1 de ligação ao elemento responsivo ao AMP cíclico
<i>CAMK2G</i>	Q13555	CHEMBL3829	Subunidade gama da proteína

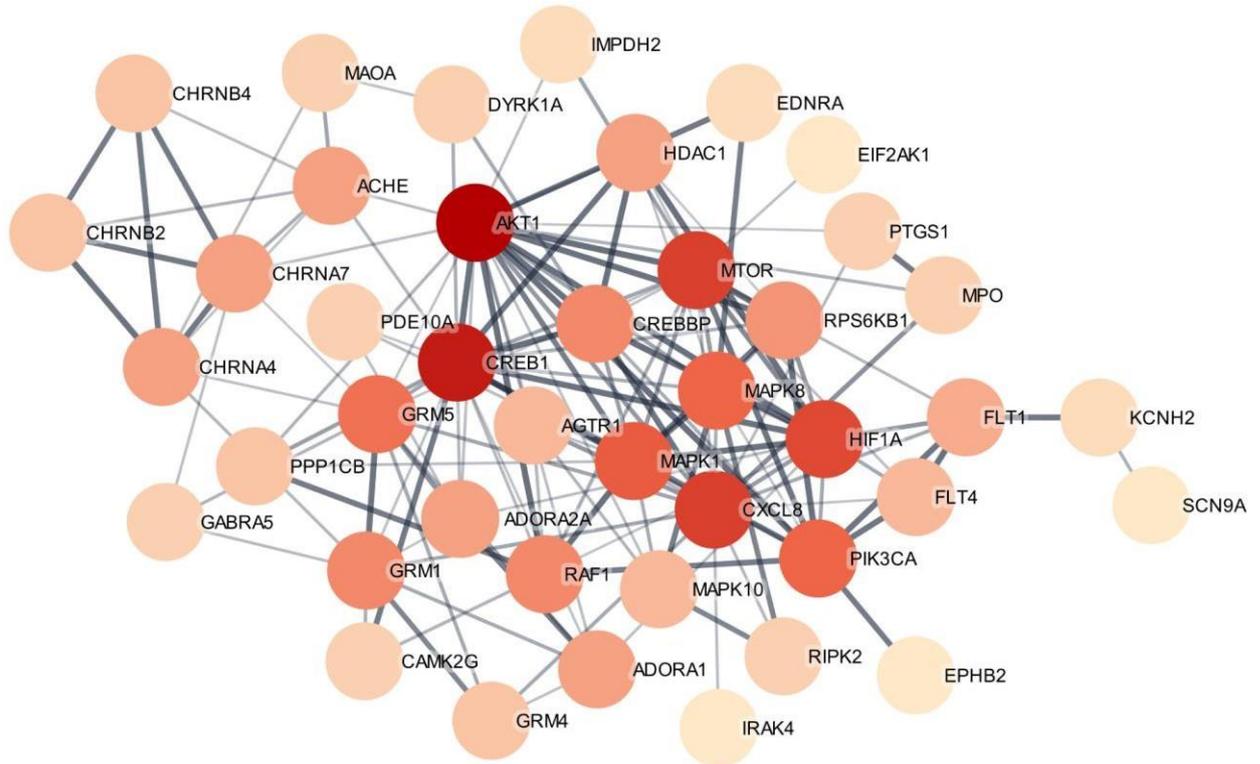
			quinase tipo II dependente de cálcio/calmodulina
<i>OTC</i>	P00480	CHEMBL2222	Ornitina transcarbamilase mitocondrial
<i>PPP1CB</i>	P62140	CHEMBL4546	Subunidade catalítica serina/treonina-proteína fosfatase PP1-beta

5.3. Construção da rede de interação PPI do PNU-120596 na memória de medo

O banco de dados String criou uma rede PPI com 143 arestas, 44 nós e um valor de p de enriquecimento PPI < 1,0-16, onde as arestas representam as interações proteína-proteína e os nós representam somente as proteínas. Os dados PPI do String foram então exportados ao Cytoscape 3.9.1 para criar uma rede PPI totalmente nova com 44 nós e 143 arestas para visualizar e avaliar as interações proteína-proteína (Figura 5).

O plugin cytoHubba no Cytoscape 3.9.1 foi usado para obter os alvos dos genes *hub* na rede. Além do mapa geral de interações, foram identificados 2 módulos densamente conectados com o plugin MCODE (Tabelas 3 e 4). Os genes *hub* da rede principal foram identificados considerando valores de MCC, DMNC, Degree, Closeness (CC) e Betweenness (Tabela 2). O diagrama de Wayne foi gerado para obter os genes consenso, e os 10 principais genes foram utilizados nas análises seguintes (Figura 6).

Figura 5 – Representação das redes PPI. Dados PPI gerados pelo Cytoscape 3.9.1, onde quanto maior a intensidade de cor, maior o grau de Degree.

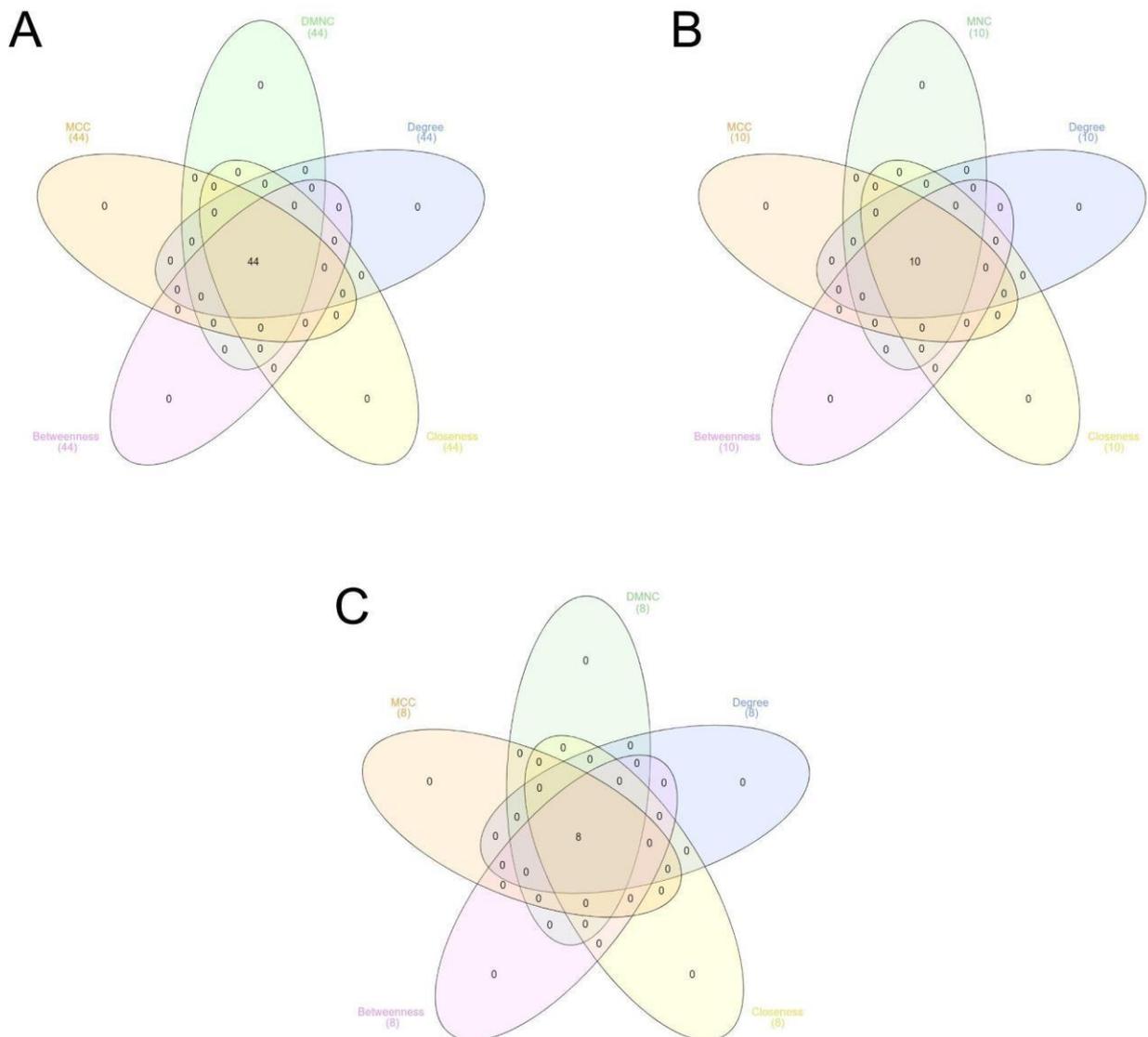


Fonte: O Autor, 2023

Os módulos significativos foram o *MTOR* e *CHRNA4*, além do módulo principal presente na Figura 5. O módulo *MTOR* contém 11 nós e 47 arestas, e o módulo *CHRNA4* tinha 8 nós e 14 arestas. A classe de receptores que compõem o módulo dois, onde receptores colinérgicos como *CHRNA7*, receptor glutamatérgico e receptores de adenosina participam, embora não exclusivamente, de processos de memória como na memória de medo (ZHANG et al., 2021; LEE et al., 2007; MOONEY-LEBER et al., 2021; SEMENOVA et al., 2012; PORTUGAL et al., 2008; XUAN et al., 2023; CONSTANTINO et al., 2021 e JABERI et al., 2016). A sinalização da via *MTOR* é importante no processo de tradução de proteínas e principalmente no contexto da memória de medo, onde no hipocampo participa dos eventos de consolidação e reconsolidação da memória de medo (XIONG et al., 2015). Ainda, o módulo *CHRNA4* possui diferentes receptores nicotínicos compostos por diferentes subunidades que conhecidamente contribuem

ativamente na memória (LI *et al.*, 2023).

Figura 6 – Diagrama de Wayne para os alvos que coincidem. (A) O diagrama de Wayne para o módulo principal. (B) O diagrama de Wayne para o módulo *MTOR* e (C) módulo *CHRNA4*.



Fonte: O Autor, 2023

Tabela 2 - Pontuações dos alvos principais do PNU-120596 (módulo principal).

Alvos	Degree	Maximal	Maximum	Closeness	Betweenness
-------	--------	---------	---------	-----------	-------------

		<i>Clique Centrality (MCC)</i>	<i>Neighborhood Component (DMNC)</i>	<i>Centrality (CC)</i>	<i>Centrality</i>
<i>CREB1</i>	20,0	7698,0	0,39917	3.008.333	27.234.174
<i>AKT1</i>	20,0	7698,0	0,39917	3.008.333	27.234.174
<i>MTOR</i>	16,0	7635,0	0,53079	2.783.333	17.971.867
<i>HIF1A</i>	15,0	7632,0	0,5408	27,0	8.056.848
<i>MAPK1</i>	13,0	6524,0	0,51092	2.541.667	4.745.806
<i>PIK3CA</i>	12,0	6505,0	0,61085	2.516.667	11.765.151
<i>MAPK8</i>	12,0	5892,0	0,51222	25,25	5.919.677
<i>RPS6KB1</i>	8,0	5760,0	0,75809	2.291.667	0,85714
<i>CREBBP</i>	9,0	962,0	0,57279	2.391.667	3.023.329
<i>HDAC1</i>	7,0	840,0	0,69516	22,25	0,53571

Tabela 3 – Pontuações dos alvos principais do PNU-120596 no módulo mTOR usando o MCODE.

<i>Alvos</i>	<i>Degree</i>	<i>Maximal Clique Centrality (MCC)</i>	<i>Maximum Neighborhood Component (DMNC)</i>	<i>Closeness Centrality (CC)</i>	<i>Betweenness Centrality</i>
<i>MTOR</i>	10,0	7320,0	0,75809	10,0	264.286
<i>HIF1A</i>	10,0	7320,0	0,75809	10,0	264.286
<i>CREB1</i>	10,0	7320,0	0,73986	10,0	264.286
<i>AKT1</i>	10,0	7320,0	0,73986	10,0	264.286
<i>MAPK1</i>	9,0	6480,0	0,73825	9,5	157.143
<i>PIK3CA</i>	9,0	6480,0	0,73825	9,5	157.143
<i>MAPK8</i>	8,0	5760,0	0,73825	9,0	0,57143
<i>RPS6KB1</i>	8,0	5760,0	0,73825	9,0	0,57143
<i>HDAC1</i>	7,0	840,0	0,71324	8,5	0,57143
<i>CREBBP</i>	7,0	840,0	0,69516	8,5	0,57143

Tabela 4 – Pontuações dos alvos principais do PNU-120596 no módulo *CHRNA4* usando o MCODE.

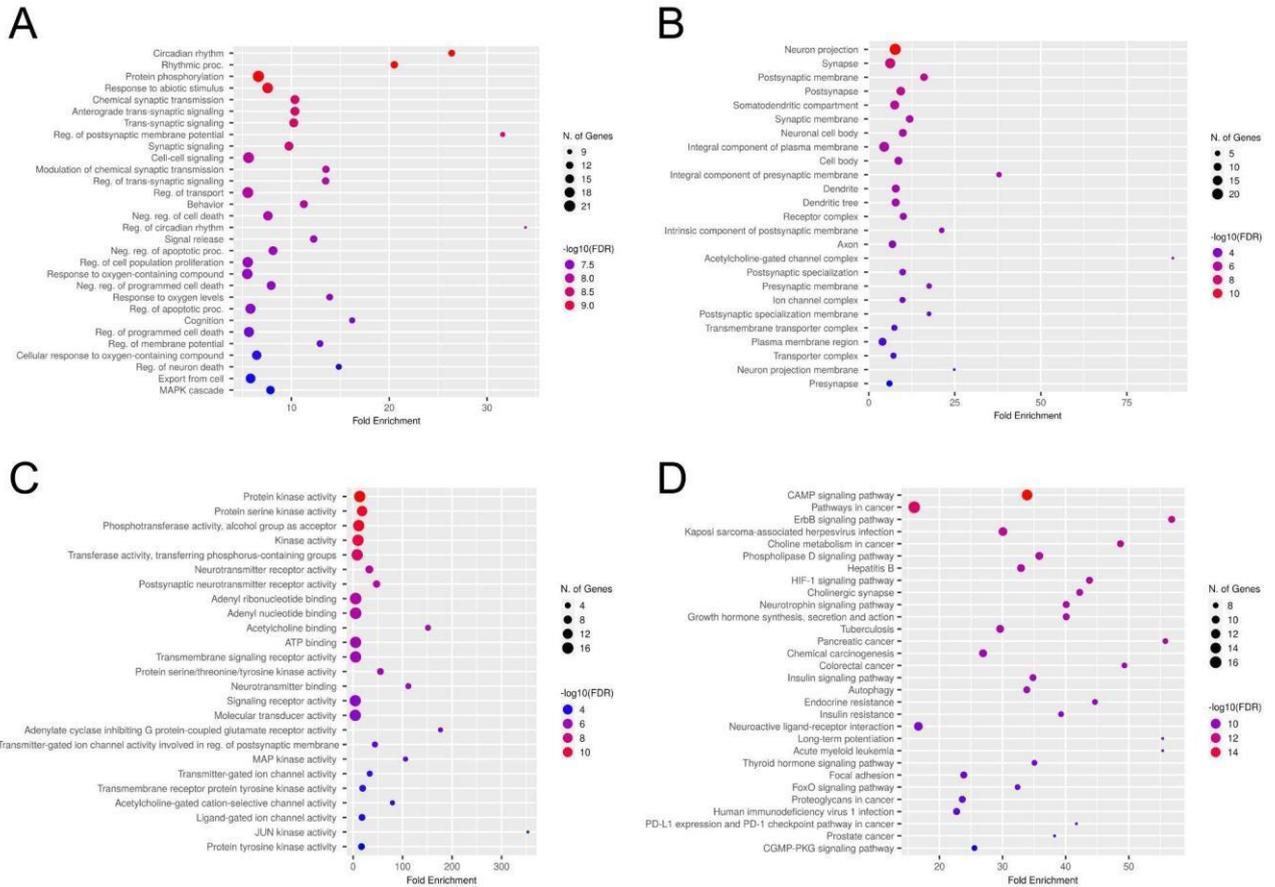
Alvos	<i>Degree</i>	<i>Maximal Clique Centrality (MCC)</i>	<i>Maximum Neighborhood Component (DMNC)</i>	<i>Closeness Centrality (CC)</i>	<i>Betweenness Centrality</i>
<i>CHRNA4</i>	5,0	25,0	0,56839	6,0	24,0
<i>CHRNA7</i>	4,0	24,0	0,56839	516,667	20,0
<i>ACHE</i>	4,0	24,0	0,56839	516,667	0,0
<i>CHRNB4</i>	4,0	24,0	0,56839	516,667	0,0
<i>CHRNB2</i>	4,0	24,0	0,56839	516,667	0,0
<i>GRM1</i>	3,0	3,0	0,30779	5,0	0,0
<i>ADORA2A</i>	2,0	2,0	0,30779	383,333	0,0
<i>ADORA1</i>	2,0	2,0	0,30779	383,333	0,0

5.4. Enriquecimento funcional por Ontologia gênica (GO) e análises de vias (KEGG)

As Análises GO e KEGG foram realizadas para investigar as funções biológicas e vias ligadas à memória de medo e ao PNU-120596. Os 30 principais termos de enriquecimento de processos biológicos, componentes celulares e função molecular foram selecionados para apresentação (Figura 7). Conforme sugerido pelos resultados, a análise dos termos (GO) mostrou o envolvimento dessas moléculas na resposta de processos biológicos relacionados ao ritmo circadiano, processos rítmicos, fosforilação de proteínas, resposta aos estímulos abióticos, sinalização sináptica e comportamento. O componente celular foi enriquecido principalmente em projeção de neurônios, sinapse, membrana sináptica, corpo celular neuronal e complexo de canais iônicos, com grande enriquecimento em componentes celulares de neurônios.

Figura 7 – Análise de enriquecimento de Ontologia gênica (GO). Top 30 dos termos enriquecidos (-Log₁₀ (valor de p)) em (A) Processos biológicos, (B) Componentes celulares,

(C) Função molecular dos genes consenso e (D) KEGG entre o PNU-120596 e a memória de medo.



Fonte: O Autor, 2023

A função molecular foi enriquecida principalmente em atividade de proteína quinase, atividade de proteína serina-quinase, atividade de fosfotransferase, atividade de quinase, atividade de transferase, entre outros. O resumo da análise de enriquecimento no DisGeNET mostrou que o enriquecimento em distúrbios de cognição, comprometimento de memória e comportamento possui pontuações altas em relação aos demais termos enriquecidos (Tabela 5). A análise de enriquecimento de via (KEGG) mostrou vias bioquímicas relacionadas a sinalização do cAMP, vias no câncer, via de sinalização ErbB, via de sinalização HIF-1, sinapse colinérgica, entre outros (Figura 7). Em geral, incluindo processos de formação e regulação mnemônica.

Tabela 5 - Sumário da análise de enriquecimento pelo DisGeNET.

GO	Descrição	N° genes	%	Log10(P)	Log10(q)
C0009241	Distúrbios Cognitivos	24	55,00	-29,00	-24,00
C0233794	Comprometimento na memória	25	57,00	-28,00	-24,00
C0020429	Hiperalgisia	17	39,00	-19,00	-15,00
C0542476	Forgetful	15	34,00	-17,00	-13,00
C0085281	Vícios comportamentais	14	32,00	-17,00	-13,00
C0740447	Neuropatia periférica diabética	11	25,00	-16,00	-13,00
C0014556	Epilepsia do Lobo Temporal	14	32,00	-16,00	-13,00
C0036220	Sarcoma de Kaposi	15	34,00	-16,00	-12,00
C0027796	Neuralgia	17	39,00	-16,00	-12,00
C0038220	Estado de mal	15	34,00	-15,00	-12,00

	epiléptico				
C0007785	Infarto cerebral	16	36,00	-15,00	-12,00
C3203102	Hipertensão arterial pulmonar idiopática	16	36,00	-14,00	-11,00
C0038525	Hemorragia subaracnóide	14	32,00	-14,00	-11,00
C0041341	Esclerose Tuberosa	12	27,00	-14,00	-11,00
C0004936	Problemas mentais	16	36,00	-14,00	-11,00
C0007682	Distúrbio do SNC	12	27,00	-14,00	-10,00
C0162770	Hipertrofia Ventricular Direita	10	23,00	-14,00	-10,00
C0002726	Amiloidose	15	34,00	-14,00	-10,00
C0282193	Sobrecarga de ferro	11	25,00	-13,00	-10,00
C0856169	Disfunção endotelial	15	34,00	-13,00	-10,00

5.5. Docking molecular do PNU-120596 nos alvos da memória de medo

O docking molecular é importante para mapear e elucidar interações fundamentais em nível atômico, sendo uma poderosa abordagem baseada em estrutura para caracterizar o comportamento de ligação de pequenas moléculas (MENG et al., 2011). De acordo com a rede PPI e o diagrama de rede “PNU-120596-memória de medo”, CREB1, AKT1, mTOR, HIF1A, MAPK1, PIK3CA, MAPK8, RPS6KB1, CREBBP, HDAC1, CHRNA4, CHRNA7, ACHE, CHRN2, CHRN4, GRM1, ADORA2A e ADORA1 foram selecionados como alvos centrais para acoplamento molecular. A pontuação total > 4,0 indica que os ligantes de docking possuem certa atividade de ligação com o alvo, a pontuação total > 5,0 indica boa atividade de ligação e a pontuação total > 7,0 indica forte atividade de ligação (LOHNING et al., 2017). A tabela 6 mostra que o PNU-120596 apresenta uma boa atividade de ligação com a AKT1, MAPK8, PIK3CA, ACHE e ADORA2A e pontuações consideráveis com o mTOR, MAPK1, HIF1A, ADORA1, RPS6KB1 e GRM1.

A Tabela 7 apresenta as interações entre o PNU-120596 e os aminoácidos de diferentes cadeias das proteínas, além da distância em Å entre o PNU-120596 e os alvos moleculares. A tabela 8 apresenta as interações dos inibidores com as proteínas alvos. Além disso, foi traçado o comparativo entre as interações moleculares do PNU-120596 e inibidores comercialmente usados para a inibição da atividade de algumas proteínas (Tabela 9). Foram selecionadas as proteínas quinases para o mapeamento das comparações, já que são proteínas fortemente envolvidas nos transtornos mentais com forte regulação biológica do medo.

O PNU-120596 estabeleceu ligação com as proteínas por meio de ligações do tipo: Pontes de hidrogênio, Alquil, Pi-alquil, Pi-sigma, Pi-Pi dupla, Pi-ânion, Pi-cátion e pontes de carbono-hidrogênio (Figura 9).

Tabela 6 - Afinidade de ligação por docking molecular entre o PNU-120596 e os alvos proteicos na memória de medo.

Ligantes	Alvos	Cadeias	PDB	Afinidade de ligação
PNU-120596	CREB1	Cadeia A	1DH3	-4,7 Kcal/mol

PNU-120596	CREB1	Cadeia C	1DH3	-4,7 Kcal/mol
PNU-120596	AKT1	Cadeia A	3O96	-8,1 Kcal/mol
PNU-120596	MTOR	Cadeia A	4JSV	-6,8 Kcal/mol
PNU-120596	HIF1A	Cadeia B	4ZPR	-6,3 Kcal/mol
PNU-120596	MAPK1	Cadeia A	4FV6	-6,7 Kcal/mol
PNU-120596	PIK3CA	Cadeia A	7R94	-7,5 Kcal/mol
PNU-120596	MAPK8	Cadeia A	4QTD	-8,0 Kcal/mol
PNU-120596	CREBBP	Cadeia A	5NLK	-5,6 Kcal/mol
PNU-120596	HDAC1	Cadeia B	4BKX	-5,8 Kcal/mol
PNU-120596	RPS6KB1	Cadeia A	7N91	-6,7 Kcal/mol
PNU-120596	RPS6KB1	Cadeia B	7N91	-6,7 Kcal/mol
PNU-120596	CHRNA4	Cadeia A	5KX1	-5,8 Kcal/mol
PNU-120596	CHRNA7	Cadeia A	7EKP	-5,5 Kcal/mol
PNU-120596	ACHE	Cadeia A	4M0E	-8,6 Kcal/mol
PNU-120596	ACHE	Cadeia B	4M0E	-8,2 Kcal/mol
PNU-120596	CHRNA4	Cadeia B	6PV7	-5,6 Kcal/mol
PNU-120596	CHRNA2	Cadeia B	6UR8	-5,5 Kcal/mol
PNU-120596	GRM1	Cadeia A	3KS9	-6,6 Kcal/mol
PNU-120596	GRM1	Cadeia B	3KS9	-6,0 Kcal/mol
PNU-120596	ADORA2A	Cadeia A	2YDV	-8,0 Kcal/mol

PNU-120596	ADORA1	Cadeia A	5UEN	-6,8 Kcal/mol
PNU-120596	ADORA1	Cadeia B	5UEN	-6,3 Kcal/mol

Tabela 7 - Mapeamento das interações do PNU-120596 com os aminoácidos dos alvos proteicos na memória de medo.

Moléculas	Resíduos de Aminoácidos e cadeias	Distância (Å)
CREB1	LYS A: 304	3,77 Å
	LYS C: 305	5,19 Å e 5,41 Å
	ARG C: 301	4,55 Å, 4,98 Å e 2,27 Å
	ARG C: 298	3,95 Å
	ARG C: 302	5,02 Å e 3,86 Å
AKT1	ASP A: 292	3,79 Å
	VAL A: 270	5,11 Å
	LYS A: 268	3,68 Å
	TRP A: 80	4,12 Å, 4,65 Å, 3,86 Å, 4,80 Å, 4,43 Å e 3,80 Å
	LEU A: 264	3,89 Å
	LEU A: 210	5,17 Å
MTOR	LEU A: 1900	4,34 Å e 3,67 Å
	GLN A: 2200	1,91 Å e 1,89 Å
	GLN A: 1937	1,87 Å e 2,41 Å
	GLU A: 2196	3,60 Å
	PRO A: 1940	4,29 Å e 4,03 Å
	ILE A: 1939	4,32 Å
	ALA A: 1971	4,39 Å
HIF1A	TYR B: 325	4,44 Å
	ARG B: 170	2,86 Å e 3,49 Å
	LYS B: 190	4,11 Å, 4,55 Å e 4,57 Å
	GLN B: 299	2,22 Å
	HIS B: 229	4,29 Å e 5,39 Å
	CYS B: 173	4,14 Å
MAPK1	LYS A: 149	2,28 Å e 2,67 Å
	SER A: 151	3,25 Å e 2,29 Å
	CYS A: 164	4,12 Å e 5,14 Å
	VAL A: 37	4,87 Å
	LEU A: 154	4,57 Å, 3,65 Å e 4,83 Å
	ALA A: 50	3,72 Å
	LEU A: 105	4,97 Å
PIK3CA	ALA A: 758	4,68 Å e 2,50 Å

	PRO A: 757	3,99 Å, 4,67 Å e 4,69 Å
	PRO A: 168	3,63 Å e 4,86 Å
	ASP A: 258	2,93 Å
	LEU A: 752	5,43 Å
	TYR A: 167	5,36 Å e 4,80 Å
	ARG A: 662	5,05 Å
	TYR A: 698	4,34 Å
MAPK8	MET A: 108	4,78 Å
	VAL A: 40	5,43 Å
	LEU A: 168	3,91 Å e 4,54 Å
	LYS A: 55	5,25 Å e 5,08 Å
	ALA A: 36	4,03 Å, 4,03 Å e 4,58 Å
	VAL A: 187	3,87 Å e 3,62 Å
	TYR A: 185	4,57 Å
	ASN A: 156	1,92 Å, 2,93 Å, 2,37 Å, 2,42 Å, 2,15 Å e 2,44 Å
CREBBP	ALA A: 1164	5,23 Å e 3,52 Å
	VAL A: 1174	5,37 Å, 5,13 Å e 3,91 Å
	PHE A: 1111	4,78 Å
	ASN A: 1168	2,64 Å
	VAL A: 1115	3,87 Å e 5,13 Å
	LEU A: 1120	4,82 Å
	ILE A: 1122	5,27 Å
HDAC1	LYS B: 342	4,85 Å
	ILE B: 345	5,21 Å e 4,29 Å
	HIS B: 344	2,75 Å
	ASP B: 340	2,58 Å
	ARG B: 310	2,40 Å
RPS6KB1	LEU A: 97	4,50 Å
	VAL A: 105	3,80 Å
	ALA A: 121	4,70 Å, 4,03 Å e 4,34 Å
	VAL A: 156	4,19 Å
	LEU A: 172	4,10 Å
	TYR A: 174	4,80 Å
	LEU A: 175	4,19 Å
	GLU A: 179	3,69 Å
	MET A: 225	3,97 Å e 5,28
	ASP A: 236	3,67 Å
	PHE A: 382	4,54 Å
	PHE A: 386	4,92 Å
	ALA B: 343	3,57 Å
	GLN B: 211	2,93 Å
	ALA B: 343	3,57 Å
	HIS B: 210	2,29 Å
	ILE B: 215	5,12 Å

	ARG B: 272	4,14 Å e 4,35 Å
CHRNA4	LYS A: 24 TRP A: 25 TRP A: 93 ARG A: 94 VAL A: 98 ALA A: 108	3,87 Å 4,67 Å 4,41 Å 4,70 Å 4,71 Å 2,36 Å
CHRNA7	CYS A: 213 SER A: 172 TRP A: 171 TYR A: 115	5,19 Å e 4,51 Å 3,55 Å 2,75 Å, 4,54 Å, 4,64 Å, 3,06 Å e 3,86 Å 4,55 Å
ACHE	TRP A: 86 GLY A: 121 TYR A: 124 SER A: 125 LEU A: 130 TRP A: 286 PHE A: 295 PHE A: 297 TYR A: 341 HIS A: 447 TYR B: 72 TRP B: 286 VAL B: 294 TYR B: 337 PHE B: 338 TYR B: 341 HIS B: 447	5,21 Å e 4,78 Å 3,58 Å 2,64 Å 2,17 Å 5,48 Å 4,57 Å 2,00 Å 4,94 Å 5,26 Å 4,72 Å 4,79 Å 4,43 Å, 5,98 Å, 4,11 Å e 4,46 Å 4,04 Å 4,79 Å e 5,40 Å 4,68 Å e 3,58 Å 4,96 Å e 5,21 Å 4,50 Å
CHRNB4	VAL B: 47 ASN B: 48 ARG B: 50 GLU B: 179 TRP B: 180 LYS B: 262 ILE B: 263	4,63 Å e 2,90 Å 2,34 Å e 2,85 Å 4,04 Å e 2,36 Å 3,31 Å 4,49 Å 4,18 Å 3,69 Å e 3,36 Å
CHRNB4	VAL B: 47 ASN B: 48 ARG B: 50 GLU B: 179 TRP B: 180 LYS B: 262 ILE B: 263	4,63 Å e 2,90 Å 2,34 Å e 1,85 Å 4,04 Å e 2,36 3,31 Å 4,49 Å 4,18 Å 3,69 Å e 3,36 Å

CHRN2	LYS B: 85	4,05 Å 3,79 Å
	TRP B: 88	5,16 Å
	LEU B: 89	4,02 Å e 5,42 Å
	ASP B: 91	4,16 Å, 2,10 Å e 2,29 Å
	THR B: 152	2,28 Å
	TYR B: 153	4,75 Å
	LYS B: 19	4,18 Å
GRM1	SER A: 186	2,55 Å
	THR A: 188	2,60 Å, 2,57 Å, 1,99 Å e 2,67 Å
	ASN A: 235	3,62 Å 5,18 Å
	TYR A: 236	4,28 Å
	LEU A: 342	2,04 Å
	LYS A: 409	4,99 Å
	HIS B: 111	2,87 Å
	ASN B: 173	4,15 Å
	ILE B: 169	4,74 Å e 5,35 Å
	LEU B: 147	
ADORA2A	ALA A: 63	4,00 Å
	ILE A: 66	4,28 Å
	LEU A: 167	5,09 Å e 5,12 Å
	PHE A: 168	4,79 Å, 3,94 Å, 4,24 Å e 4,64 Å
	LEU A: 249	5,16 Å e 4,60 Å
	LEU A: 267	4,63 Å e 3,97 Å
	ILE A: 274	3,72 Å
ADORA1	ILE A: 69	5,34 Å
	VAL A: 87	4,11 Å e 5,36 Å
	PHE A: 171	4,58 Å e 3,62 Å
	TRP A: 247	4,96 Å
	LEU A: 250	5,20 Å, 4,08 Å e 5,13 Å
	ILE A: 274	5,22 Å
	HIS A: 278	2,37 Å
	ALA A: 66	4,61 Å
	VAL B: 62	4,43 Å e 3,49 Å
	LEU B: 65	4,84 Å
	ALA B: 66	4,49 Å e 3,73 Å
	ILE B: 69	3,68 Å
	VAL B: 83	5,41 Å e 4,58 Å
	ILE B: 271	4,23 Å e 4,22 Å
	ILE B: 274	3,93 Å
HIS B: 278	4,85 Å e 3,54 Å	

Tabela 8 – Mapeamento das interações moleculares de inibidores aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) e as proteínas quinases alvos na memória de medo usando o sítio de ligação onde houve o docking do PNU-120596 nos alvos.

Proteínas alvo	Inibidores	Resíduos de aminoácidos e cadeias	Distância (Å)
AKT1	AKT VIII	ASN A: 54 TRP A: 80 ILE A: 84 SER A: 205 LEU A: 210 LEU A: 264 LYS A: 268 VAL A: 270 ARG A: 273 TYR A: 326	2.14 Å 3.70 Å, 4.55 Å, 4.22 Å, 3.86 Å, 5.55 Å e 4.38 Å 4.68 Å e 4.26 Å 2.69 Å 4.53 Å 5.24 Å e 5.36 Å 2.55 Å, 2.81 Å, 3.77 Å e 4.24 Å 5.05 Å e 5.14 Å 5.27 Å, 4.35 Å, 3.94 Å e 2.71 Å 2.71 Å
MAPK1	Tizaterkib	GLU A: 31 TRP A: 34 LYS A: 52 TYR A: 111 LYS A: 149 GLY A: 32	4.40 Å 3.67 Å 5.11 Å e 3.72 Å 5.31 Å 5.02 Å, 2.86 Å e 2.81 Å 4.40 Å
MAPK8	SCH772984	ILE A: 32 GLY A: 38 VAL A: 40 ALA A: 53 ARG A: 69 MET A: 111 GLN A: 117 VAL A: 158 LEU A: 168 ASP A: 169 LEU A: 172 VAL A: 187 ARG A: 192	4.51 Å, 3.97 Å e 5.43 Å 3.66 Å 4.57 Å 4.73 Å e 5.02 Å 3.37 Å 2.25 Å 3.58 Å 3.92 Å e 4.99 Å 4.86 Å 3.80 Å 3.91 Å 4.95 Å e 4.95 Å 3.98 Å
mTOR	Rapamicina	GLU A: 2196 VAL A: 2227	3.12 Å 3.72 Å

		ARG A: 2224	2.74 Å e 2.83 Å
PI3K	Idelalisib	ARG A: 662	3.27 Å
		PHE A: 666	4.93 Å, 4.49 Å e 4.06 Å
		LEU A: 755	4.14 Å
		ASN A: 756	3.06 Å
		LEU A: 814	5.23 Å
		ARG A: 818	2.42 Å
		CYS A: 838	2.69 Å
		LEU A: 839	4.42 Å

Tabela 9 - Interações moleculares comuns ao PNU-120596 e aos inibidores nos alvos proteicos.

Proteínas alvo	Inibidores	Resíduos de aminoácidos e cadeias
AKT1	AKT VIII PNU-120596	VAL A: 270 LYS A: 268 TRP A: 80 LEU A: 264 LEU A: 210
MAPK1	Tizaterkib PNU-120596	LYS A: 149
MAPK8	SCH772984 PNU-120596	VAL A: 40 LEU A: 168 VAL A: 187
mTOR	Rapamicina PNU-120596	GLU A: 2196
PI3K	Idelalisib PNU-120596	ARG A: 662

Figura 8 – Poses dos ligantes PNU-120596 (amarelo) e os inibidores (azul) no sítio ativo dos alvos proteicos.

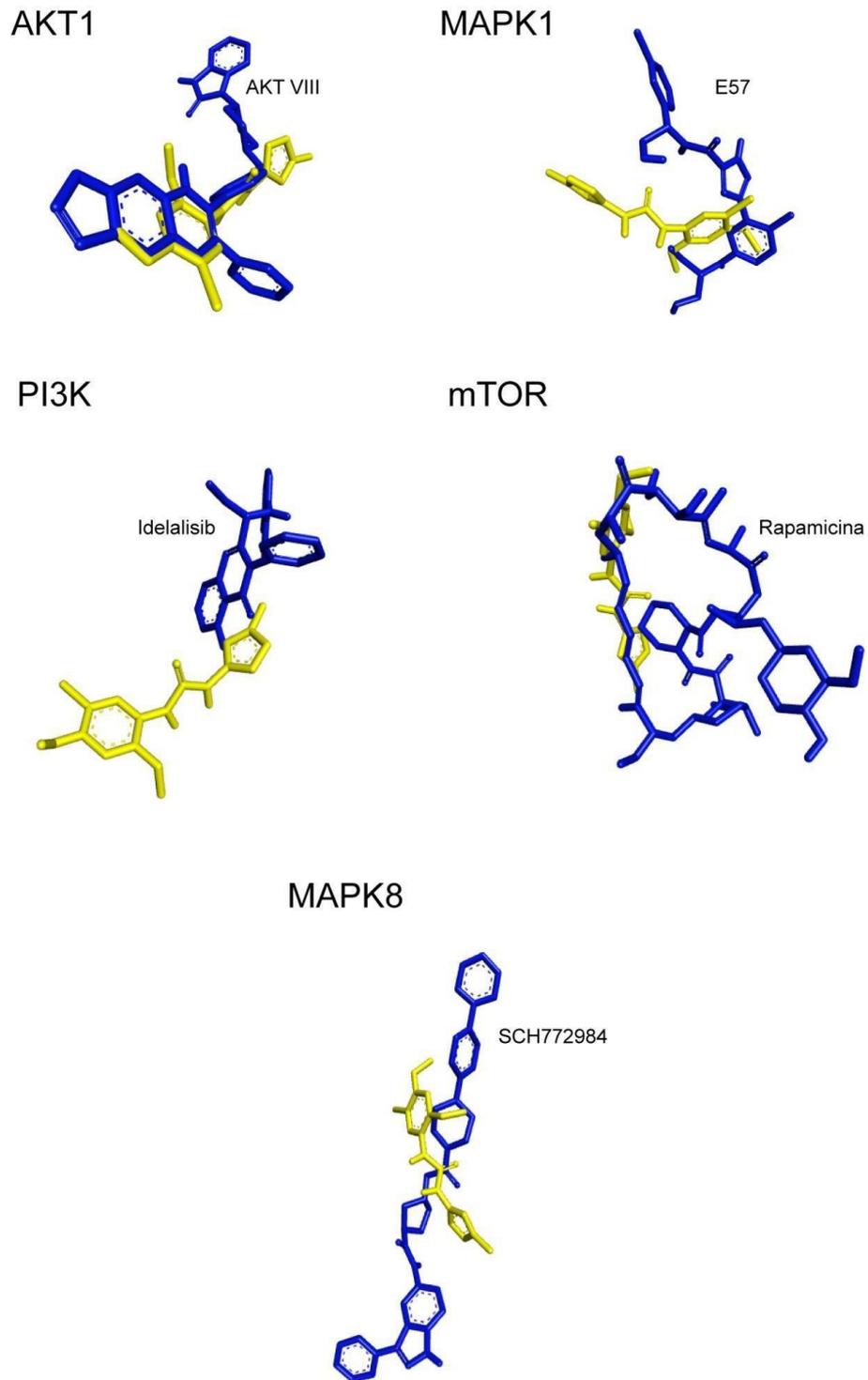
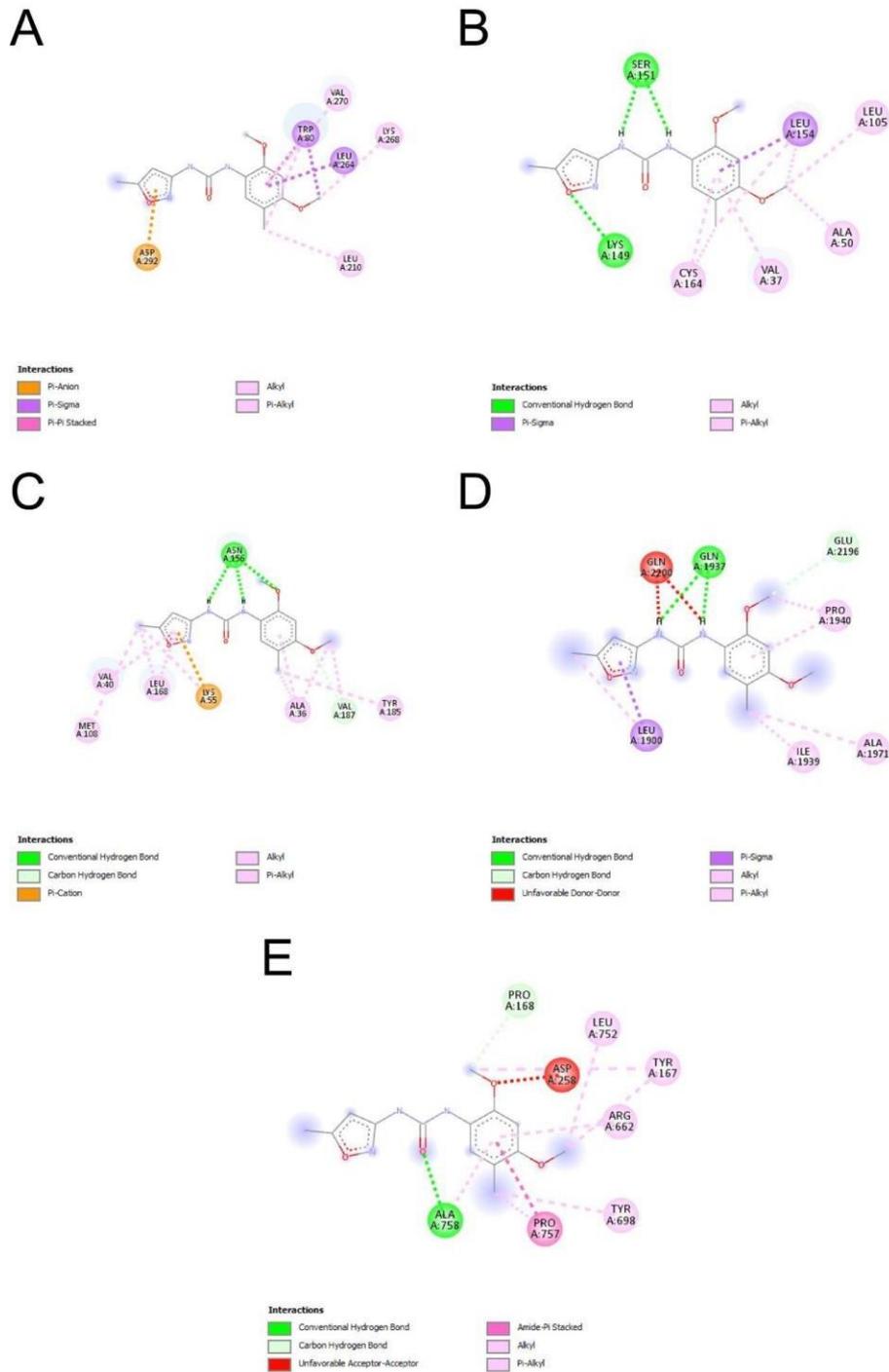


Figura 9 - Estrutura planar do PNU-120596 com ligações nos aminoácidos das proteínas. (A) AKT1, (B) MAPK1, (C) MAPK8, (D) MTOR e (E) PIK3CA (PI3K).



Fonte: O Autor, 2023

5.6. DISCUSSÃO

A memória de medo é um processo neurobiológico importante para a sobrevivência das espécies, sendo um estado de sentimentos inatos ou aprendidos gerados pela exposição a eventos ameaçadores reais ou imaginários, como os eventos traumáticos (SOUZA, 2022). A desregulação no processamento do medo ou a exacerbação dos sinais bioquímicos e dos eixos nervosos que o regulam estão presentes nos transtornos mentais, como no transtorno pós-traumático e de ansiedade. Em 2019, as despesas médicas no manejo e tratamento de adultos com transtornos mentais totalizaram US\$ 106,5 bilhões nos EUA, o que torna necessária a descoberta e o desenvolvimento de novos medicamentos com potencial terapêutico significativo. Identificar a segurança e a eficácia dos medicamentos para o manejo dos transtornos mentais associados a traumas nos quais a memória de medo é fator essencial no agravamento dos casos é uma necessidade urgente (SONI, 2022).

O PNU-120596 tem sido utilizado em modelos animais para estudar os mecanismos de memória decorrentes da ativação do receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7$; entretanto, as evidências atuais apontam para suas interações com proteínas celulares independentes do $\alpha 7$ nAChR, permitindo o estudo de tais mecanismos.

Neste estudo investigamos as principais interações moleculares entre o PNU-120596 e proteínas relacionadas ao processamento de memórias de medo, através da farmacologia de rede. Após uma triagem topológica da rede formada pela análise de proteína-proteína, CREB1, AKT1 e MTOR foram os três principais alvos relevantes na rede principal. Isto implica que o PNU-120596 pode ser crucial ao interagir com esses alvos proteicos. CREB1 é uma proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP, um fator de transcrição que é membro da família de leucinas de ligação ao DNA. Estudos apontam para o aumento de CREB1 na amígdala após o condicionamento de medo, o que pode ser importante na repercussão das emoções após eventos traumáticos. Além disso, a fosforilação do CREB1 auxilia na consolidação da memória de medo após regular positivamente a expressão do BDNF por meio da ligação ao seu promotor (KUMARI *et al.*, 2020). A morte induzida de neurônios com superexpressão de CREB1 é capaz de interromper a memória de medo (ALBERINI E KANDEL *et al.*, 2014).

As proteínas serina/treonina quinases AKT1, AKT2 e AKT3 são membros da

família AKT. A proteína quinase AKT desempenha um papel importante na plasticidade sináptica, impactando significativamente as respostas ao estresse e a extinção do medo (WONG *et al.*, 2020). A sinalização de AKT é aumentada na amígdala com estresse traumático pelo aumento da fosforilação de AKT, e há mudanças na dinâmica da sinalização de AKT fosforilada por seu aumento em animais submetidos a estresse durante a formação da memória de medo (KNOX *et al.*, 2021). O alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é uma proteína quinase serina/treonina que modula o crescimento celular, a propagação e a plasticidade sináptica. Estudos anteriores relataram a ativação (fosforilação) do mTOR como tendo um papel neuroprotetor, no entanto, estudos subsequentes mostraram que o excesso de ativação do mTOR causa inibição da autofagia que protege o tecido nervoso, causando déficits neurocomportamentais e de memória. A atividade mTOR é aumentada no condicionamento do medo no córtex pré-frontal, onde aumentos exacerbados na via mTOR podem ser prejudiciais e a inibição seletiva pode inibir a reconsolidação contextual do medo (BLUNDELL *et al.*, 2008; HAMDAMI *et al.*, 2021).

Dois módulos dentro da rede principal denominados *MTOR* e *CHRNA4*, respectivamente, foram identificados na rede PPI. No módulo *MTOR*, os genes *MTOR*, *HIF1A* e *CREB1* foram os 3 genes centrais classificados. No módulo *CHRNA4*, os genes *CHRNA4*, *CHRNA7* e *ACHE* foram os 3 genes centrais classificados. O HIF1A é um fator de transcrição que atua como mediador crítico das adaptações celulares à hipóxia e pode levar ao estresse oxidativo ao gerar espécies reativas de oxigênio. A influência do HIF1A nos mecanismos de memória e aprendizagem não é atualmente bem compreendida, particularmente o seu papel na memória de medo. No entanto, o aumento nos níveis de HIF1A possivelmente leva à supressão da potenciação de longo prazo do hipocampo. Além disso, o HIF1A afeta a plasticidade sináptica, o que pode ser um dos mecanismos que explicam os danos à memória (ARIAS-CAVIERES *et al.*, 2020). A família do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) consiste em cinco subunidades dispostas em torno de um poro aquoso. Os receptores nAChR possuem subunidades divididas em (α 2- α 7, α 9 e α 10) e beta (β 2- β 4) (DANI, 2015). Evidências mostram o envolvimento do nAChR no hipocampo dorsal e ventral e no córtex pré-frontal medial, produzindo diferentes efeitos no condicionamento do medo. Naturalmente, esses receptores são ativados pela ligação à acetilcolina, provocando sua abertura e o influxo de Ca^{2+} . A acetilcolina é um importante neurotransmissor que

regula processos neurocomportamentais, e cognitivos. O aumento dos níveis de acetilcolina na amígdala ocorre nos momentos de apresentação de sugestões condicionantes da memória de medo. Além disso, a acetilcolina desempenha um papel na atenção durante as tarefas de aprendizagem e o efluxo de acetilcolina na amígdala aumenta durante a extinção de memórias aversivas. No geral, o sistema colinérgico é importante no processamento de memórias aversivas (KELLIS *et al.*, 2020).

A análise de enriquecimento funcional e de enriquecimento KEGG mostrou os diferentes papéis dos genes enriquecidos em diferentes atividades biológicas e processos bioquímicos. Os genes enriquecidos para processos biológicos estão relacionados à fosforilação de proteínas, respostas a estímulos abióticos e sinalização sináptica, comportamento e cognição. Os mecanismos de fosforilação de proteínas são cruciais na memória. Estudos demonstraram que as proteínas quinases desempenham um papel fundamental na formação da memória, incluindo a memória de medo contextual (ROSENEGGER *et al.*, 2008). O enriquecimento de componente celular foi relacionado a componentes celulares de neurônios, como projeções neuronais, sinapses e membranas pós-sinápticas, além da função molecular estar envolvido em proteína quinase, proteína serina quinase, atividade de fosfotransferase e atividade de Transferase. As projeções neuronais e as sinapses químicas entre os neurônios da amígdala são importantes para regular a extinção do medo. Por exemplo, a amígdala basolateral é responsável, por meio de projeções neuronais, por modular diferentes tipos de memória, incluindo a memória de medo (WAHISTROM *et al.*, 2018). Além disso, o condicionamento do medo causa aumento nas taxas de disparos evocados por tons em neurônios na região da amígdala lateral. Em geral, como a amígdala tem forte relação com a memória de medo, muitas das projeções neuronais relacionadas à memória de medo ocorrem em sua estrutura; por exemplo, após mecanismos de associação do medo auditivo, a plasticidade sináptica associativa são induzidas em entradas para a região do núcleo central da amígdala (LUCHKINA E BOLSHAKOV *et al.*, 2018).

Todos os processos de plasticidade sináptica requerem a atividade de proteínas quinases que modificam sua estrutura e a capacidade de interagir com outras proteínas que regulam a memória de medo (GIESE E MIZUNO, 2013). Por exemplo, a hiperativação da atividade da via MAPK está relacionada ao aumento da memória contextual do medo (PHASUK *et al.*, 2021). A análise da via KEGG de que estes 44

alvos foram enriquecidos principalmente no cAMP mostrou maior enriquecimento de genes para a via de sinalização do cAMP. Relatórios anteriores demonstraram que a ativação da via do cAMP também influencia diretamente a memória de medo, onde o aumento da sinalização de cAMP pode alterar o equilíbrio entre a extinção do medo e o aumento da memória de medo (SHI *et al.*, 2019).

O estudo de acoplamento molecular foi utilizado para avaliar as interações entre proteínas relacionados à memória de medo e o PNU-120596. O PNU-120596 mostrou uma pontuação de ligação forte com ligantes como AKT1, PIK3CA, MAPK8, ACHE e ADORA2A. Os tipos de conexões encontradas, como Pi-Ânion, Pi-Sigma, Pi-Pi, Alquil, Pi-Alquil, Ligação de Hidrogênio Convencional, Pi-Cation, Amida-Pi, Pi, Ligação de Hidrogênio Doador, doador-doador desfavorável, ligações de carbono e hidrogênio, Pi-Enxofre são elos essenciais que devem ser estudados na interação entre PNU-120596 e proteínas alvo. Além disso, os dados de docking molecular relacionados ao comparativo entre as ligações do PNU-120596 e os inibidores aprovados e amplamente utilizados mostram que o PNU-120596 apresenta interações com os alvos nas mesmas regiões que os inibidores interagem, como por exemplo a AKT1 e MAPK8.

Na figura 8 está ilustrada a disposição espacial das moléculas, tanto do PNU-120596 quanto dos inibidores e é possível observar a interação de ambas as moléculas em um ambiente similar. Embora o PNU-120596 não apresenta flexibilidade parecida com a de alguns inibidores é clara a sua interação no sítio e aminoácidos dos alvos proteicos. O PNU-120596 estabeleceu ligações do tipo Alquil e Pi-alquil com todas as proteínas quinases avaliadas (Figura 9). Essas ligações, tal como interações não covalentes envolvendo sistemas Pi são fundamentais para os eventos biológicos, como o reconhecimento de proteína-ligantes (CHEM *et al.*, 2003). As pontes de hidrogênio geralmente são consideradas facilitadoras de interações entre proteína-ligante (CHEN *et al.*, 2016) e algumas proteínas estabeleceram tais interações com o ligante.

De maneira geral, o ligante PNU-120596 apresentou boa interação com proteínas quinases e outras proteínas com participação sobre a memória de medo. Sendo assim, a partir dos estudos *in silico* as análises *in vitro* podem ser realizadas visando avaliar se há o estabelecimento de ligações moleculares entre o PNU-120596 e as proteínas alvo de forma experimental *in vitro*.

5.7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados pela elaboração deste estudo podem indicar novas aplicações do PNU-120596 e determinar novos mecanismos moleculares do seu envolvimento sobre a memória de medo, gerando dados essenciais que norteiem a elaboração de novos estudos *in vitro* e *in vivo*. Neste sentido, a farmacologia de rede surge como uma ferramenta promissora na avaliação e *screening in silico* de biomoléculas e na predição de interações moleculares facilitando e acelerando o processo de desenvolvimento de novos fármacos.

O modelo matemático das ciências de rede mostrou os principais genes *hub* na memória de medo, principalmente o envolvimento de proteínas quinases na rede de interação. Alguns alvos da memória de medo encontrados nos bancos de dados são comuns também ao PNU-120596. Além disso, as análises de enriquecimento evidenciaram o envolvimento dos 44 genes enriquecidos em mecanismos de memória e vias de sinalização relacionados à memória de medo.

Os estudos em modelos animais complexos apresentam alto custo e necessariamente mais demorados. Assim, ferramentas e estudos computacionais fornecem informações específicas e adicionais quando a determinados alvos para o direcionamento de futuros estudos. Além disso, mostra-se como uma alternativa econômica para a elaboração de diversos estudos, além de possibilitar o aprofundamento dos estudos científicos já publicados.

No entanto, parte das proteínas obtidas pelas bases de dados relacionados à memória de medo são proteínas comuns ao processo de memória, não somente a memória de medo. Tal limitação pode indicar a necessidade do refinamento nas buscas em bancos de dados ou em alvos isolados já conhecidos por modular isoladamente a memória de medo. Contudo, tais resultados obtidos neste estudo são passíveis de conhecimento científico, tendo em vista a avaliação do PNU-120596 em outros alvos moleculares.

5.8. REFERÊNCIAS

ALBERINI, C. M.; KANDEL, E. R. The Regulation of Transcription in Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 7, n. 1, p. a021741, 4 dez. 2014.

ALZAREA, S.; RAHMAN, S. Effects of alpha-7 nicotinic allosteric modulator PNU 120596 on depressive-like behavior after lipopolysaccharide administration in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 86, p. 218–228, ago. 2018.

ALZAREA, S.; RAHMAN, S. Effects of alpha-7 nicotinic allosteric modulator PNU 120596 on depressive-like behavior after lipopolysaccharide administration in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 86, p. 218–228, ago. 2018.

ARIAS-CAVIERES, A. et al. A HIF1a-Dependent Pro-Oxidant State Disrupts Synaptic Plasticity and Impairs Spatial Memory in Response to Intermittent Hypoxia. *ENeuro*, v. 7, n. 3, p. ENEURO.0024-20.2020, 1 maio 2020.

BLUNDELL, J.; KOUSER, M.; POWELL, C. M. Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 90, n. 1, p. 28–35, jul. 2008.

BOURNE, P. E.; WEISSIG, H. *Structural Bioinformatics*. 1. ed. New Jersey, Estados Unidos da América: Wiley-Liss, 2003. V. 1.

BOURTCHULADZE, R. et al. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, v. 79, n. 1, p. 59–68, out. 1994.

CALLAHAN, P. M. et al. Positive allosteric modulator of alpha 7 nicotinic-acetylcholine receptors, PNU-120596 augments the effects of donepezil on learning and memory in aged rodents and non-human primates. *Neuropharmacology*, v. 67, p. 201–212, 1 abr. 2013.

- CHEN, D. et al. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Science Advances*, v. 2, n. 3, 25 mar. 2016.
- CONSTANTINO, L. C. et al. Functional interplay between adenosine A2A receptor and NMDA preconditioning in fear memory and glutamate uptake in the mice hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 180, p. 107422–107422, 1 abr. 2021.
- DANI, J. A. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *International Review of Neurobiology*, v. 124, p. 3–19, 2015.
- DIAS, R.; AZEVEDO, W. F. De A. Molecular Docking Algorithms. *Current Drug Targets*, [s.d.]. v. 9, n. 12, p. 1040–1047.
- DUNCAN, L. E. et al. Largest GWAS of PTSD (N=20 070) yields genetic overlap with schizophrenia and sex differences in heritability. *Molecular Psychiatry*, v. 23, n. 3, p. 666–673, 25 abr. 2017.
- FANSELOW, M. S.; STERLACE, S. R. Pavlovian Fear Conditioning. p. 117–141, 23 maio 2014.
- GAIDHANI, N.; UTESHEV, V. V. Treatment duration affects cytoprotective efficacy of positive allosteric modulation of $\alpha 7$ nAChRs after focal ischemia in rats. *Pharmacological Research*, v. 136, p. 121–132, out. 2018.
- GAUTHIER, J. et al. A brief history of bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, 27 nov. 2019. v. 20, n. 6, p. 1981–1996.
- GIESE, K. P.; MIZUNO, K. The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & Memory*, v. 20, n. 10, p. 540–552, 16 set. 2013.
- GOWAYED, M. A. et al. The $\alpha 7$ nAChR allosteric modulator PNU-120596 amends neuroinflammatory and motor consequences of parkinsonism in rats: Role of JAK2/NF- κ B/GSk3 β / TNF- α pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 148, p. 112776–112776, 1 abr. 2022.

- HURST, R. S. A Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor: In Vitro and In Vivo Characterization. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 17, p. 4396–4405, 27 abr. 2005.
- HURST, R. S. A Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor: In Vitro and In Vivo Characterization. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 17, p. 4396–4405, 27 abr. 2005.
- IDEKER, T.; GALITSKI, T.; HOOD, L. A NEW APPROACH TO DECODING LIFE: Systems Biology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 2, n. 1, p. 343–372, set. 2001.
- IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. *Physiological Reviews*, v. 96, n. 2, p. 695–750, abr. 2016.
- IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. *Physiological Reviews*, v. 96, n. 2, p. 695–750, abr. 2016.
- JABERI, E. et al. Mutation in *ADORA1* identified as likely cause of early-onset parkinsonism and cognitive dysfunction. *Movement Disorders*, v. 31, n. 7, p. 1004–1011, 2 maio 2016.
- JOHANSEN, JOSHUA P. et al. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell*, v. 147, n. 3, p. 509–524, out. 2011.
- JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking¹¹ Edited by F. E. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, 4 abr. 1997a. v. 267, n. 3, p. 727–748.
- JOSSELYN, S. A. et al. Long-Term Memory Is Facilitated by cAMP Response Element-Binding Protein Overexpression in the Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 7, p. 2404–2412, 1 abr. 2001.
- JOVANOVIĆ, T. et al. Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 2, p. 695–704, fev. 2012.

- JUNSUKE UWADA et al. PNU-120596, a positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, directly inhibits p38 MAPK. *Biochemical Pharmacology*, v. 182, p. 114297–114297, 1 dez. 2020.
- JUNSUKE UWADA et al. PNU-120596, a positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, directly inhibits p38 MAPK. *Biochemical Pharmacology*, v. 182, p. 114297–114297, 1 dez. 2020.
- KELLIS, D. M. et al. Cholinergic neurotransmission in the basolateral amygdala during cued fear extinction. *Neurobiology of Stress*, v. 13, p. 100279, nov. 2020.
- KIM, Y.-K. Panic Disorder: Current Research and Management Approaches. *Psychiatry Investigation*, v. 16, n. 1, p. 1–3, 25 jan. 2019.
- KITANO, Hiroaki. Computational systems biology. *Nature*, v. 420, n. 6912, p. 206-210, Nov. 2002b.
- KITANO, Hiroaki. Systems Biology: A Brief Overview. *Science*, v. 295, n. 5560, p. 1662-1664, Mar, 2002a.
- KNOX, D. et al. PI3K-Akt Signaling in the Basolateral Amygdala Facilitates Traumatic Stress Enhancements in Fear Memory. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 24, n. 3, p. 229–238, 5 nov. 2020.
- KOENEN, K. C. et al. Posttraumatic stress disorder and treatment seeking in a national screening sample. *Journal of Traumatic Stress*, v. 16, n. 1, p. 5–16, fev. 2003.
- KUMARI, P. et al. Hypobaric hypoxia induced fear and extinction memory impairment and effect of Ginkgo biloba in its amelioration: Behavioral, neurochemical and molecular correlates. *Behavioural Brain Research*, v. 387, p. 112595, jun. 2020.
- KYRIAKOULIS, P.; KYRIOS, M. Biological and cognitive theories explaining panic disorder: A narrative review. *Frontiers in Psychiatry*, v. 14, 30 jan. 2023.
- LEE, J. et al. Association study of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit gene, *CHRNA4*, in attention-deficit hyperactivity disorder. *Genes, Brain and Behavior*, v. 0, n. 0, p. 070514070132001-???, 14 maio 2007.

- LI, D. et al. Decreased expression of Chrna4 by METTL3-mediated m6A modification participates in BPA-induced spatial memory deficit. *Environmental Research*, v. 236, p. 116717–116717, 1 nov. 2023.
- LUCHKINA, N. V.; BOLSHAKOV, V. Y. Mechanisms of fear learning and extinction: synaptic plasticity–fear memory connection. *Psychopharmacology*, v. 236, n. 1, p. 163–182, 10 nov. 2018.
- MCLEAN, S. et al. PNU-120596, a positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors, reverses a sub-chronic phencyclidine-induced cognitive deficit in the attentional set-shifting task in female rats. *Journal of Psychopharmacology*, v. 26, n. 9, p. 1265–1270, 1 set. 2012.
- MELLO E SOUZA, T. Unraveling Molecular and System Processes for Fear Memory. *Neuroscience*, v. 497, p. 14–29, ago. 2022.
- MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, [s.d.]. v. 7, n. 2, p. 146–157.
- MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*, [s.d.]. v. 7, n. 2, p. 146–157.
- MERIAN, A. N. et al. Post-traumatic Stress Disorder. *Medical Clinics*, v. 107, n. 1, p. 85–99, 1 jan. 2023.
- MERIAN, A. N. et al. Post-traumatic Stress Disorder. *Medical Clinics*, v. 107, n. 1, p. 85–99, 1 jan. 2023.
- MEYER, E. A.; CASTELLANO, R. K.; DIEDERICH, F. Interactions with Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 42, n. 11, p. 1210–1250, 17 mar. 2003.
- MOJGAN HAMDAMI et al. The effects of lithium chloride and cathodal/anodal transcranial direct current stimulation on conditional fear memory changes and the level of p-mTOR/mTOR in PFC of male NMRI mice. *Metabolic Brain Disease*, v. 36, n. 2, p. 327–337, 21 nov. 2020.

- MOONEY-LEBER, S. M. et al. Genetic Differences in Dorsal Hippocampus Acetylcholinesterase Activity Predict Contextual Fear Learning Across Inbred Mouse Strains. *Frontiers in Psychiatry*, v. 12, 18 out. 2021.
- MORGON, N. H.; COUTINHO, K. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 1. ed. São Paulo: Livraria da Física, 2007. V. 1.
- NOOR, F. et al. Network Pharmacology Approach for Medicinal Plants: Review and Assessment. *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 5, p. 572, 4 maio 2022.
- PARK, H. R.; CAI, M.; YANG, E. J. Neurogenic Interventions for Fear Memory via Modulation of the Hippocampal Function and Neural Circuits. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 7, p. 3582, 25 mar. 2022.
- PAVLOV, Y. G. et al. Fear memory in humans is consolidated over time independently of sleep. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 14 out. 2022.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, jan. 2019. v. 20, n. 18, p. 4331.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, jan. 2019. v. 20, n. 18, p. 4331.
- POLONI, Joice de Faria et al. *Biologia de Sistemas*. In: VERLI, Hugo (org.). *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. p. 116-146.
- PORTUGAL, G. S.; KENNEY, J. W.; GOULD, T. J. β 2 subunit containing acetylcholine receptors mediate nicotine withdrawal deficits in the acquisition of contextual fear conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 89, n. 2, p. 106–113, fev. 2008.
- RESSLER, KERRY. J. et al. Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nature Reviews Neurology*, v. 18, n. 5, p. 273–288, 29 mar. 2022.
- ROSENEGGER, D.; PARVEZ, K.; LUKOWIAK, K. Enhancing memory formation by altering protein phosphorylation balance. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 90, n. 3, p. 544–552, out. 2008.

SANTANA, C. A. et al. GRaSP: a graph-based residue neighborhood strategy to predict binding sites. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 36, n. Suppl_2, p. i726–i734, 30 dez. 2020.

SARAYUT PHASUK et al. Enhanced contextual fear memory in peroxiredoxin 6 knockout mice is associated with hyperactivation of MAPK signaling pathway. *Molecular Brain*, v. 14, n. 1, 25 fev. 2021.

SCHAFE, G. E. et al. Activation of ERK/MAP Kinase in the Amygdala Is Required for Memory Consolidation of Pavlovian Fear Conditioning. *The Journal of Neuroscience*, v. 20, n. 21, p. 8177–8187, 1 nov. 2000.

SCHAFE, G. E. et al. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends in Neurosciences*, v. 24, n. 9, p. 540–546, set. 2001.

SEMENOVA, S. et al. Mice Lacking the $\beta 4$ Subunit of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Show Memory Deficits, Altered Anxiety- and Depression-Like Behavior, and Diminished Nicotine-Induced Analgesia. *Nicotine & Tobacco Research*, v. 14, n. 11, p. 1346–1355, 9 maio 2012.

SHI, Y.-W. et al. Fear renewal activates cyclic adenosine monophosphate signaling in the dentate gyrus. *Brain and behavior*, v. 9, n. 8, 17 jul. 2019.

SONI, A. Healthcare Expenditures for Treatment of Mental Disorders: Estimates for Adults Ages 18 and Older, U.S. Civilian Noninstitutionalized Population, 2019.

Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581181/#:~:text=Medical%20spending%20to%20treat%20adults>.

SOUDIJN, W.; VAN WIJNGAARDEN, I.; IJZERMAN, A. P. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: perspectives and recent developments. *Drug Discovery Today*, v. 9, n. 17, p. 752–758, set. 2004.

SUN, J. et al. Interpreting the Molecular Mechanisms of Yinchenhao Decoction on Hepatocellular Carcinoma through Absorbed Components Based on Network Pharmacology. *BioMed Research International*, v. 2021, p. 1–22, 19 maio 2021.

- SUN, J. et al. Interpreting the Molecular Mechanisms of Yinchenhao Decoction on Hepatocellular Carcinoma through Absorbed Components Based on Network Pharmacology. *BioMed Research International*, v. 2021, p. 1–22, 19 maio 2021.
- SYED FAHAD JAVAID et al. Epidemiology of anxiety disorders: global burden and sociodemographic associations. v. 30, n. 1, 26 maio 2023.
- SZABO, A. K. et al. Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, v. 81, p. 42–54, jun. 2014.
- SZABO, A. K. et al. Mode of action of the positive modulator PNU-120596 on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, v. 81, p. 42–54, jun. 2014.
- TERRANOVA, J. I. et al. Hippocampal-amygdala memory circuits govern experience-dependent observational fear. *Neuron*, fev. 2022.
- TRIPATHI, A.; BANKAITIS, V. A. Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock. *Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications*, 2017. v. 2, n. 1.
- 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*, 2010. v. 31, n. 2, p. 455–461.
- 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*, 2010. v. 31, n. 2, p. 455–461.
- VAN WESTEN, G. J. P.; GAULTON, A.; OVERINGTON, J. P. Chemical, Target, and Bioactive Properties of Allosteric Modulation. *PLoS Computational Biology*, v. 10, n. 4, p. e1003559, 3 abr. 2014.
- VICECONTI, M. et al. Credibility of In Silico Trial Technologies—A Theoretical Framing. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics*, jan. 2020. v. 24, n. 1, p. 4–13.
- VULFIUS, C. A. et al. PNU-120596, a positive allosteric modulator of mammalian $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, is a negative modulator of ligand-gated chloride-selective channels of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Neurochemistry*, v. 155, n. 3, p. 274–284, 19 abr. 2020.

- WAHLSTROM, K. L. et al. Basolateral Amygdala Inputs to the Medial Entorhinal Cortex Selectively Modulate the Consolidation of Spatial and Contextual Learning. *The Journal of Neuroscience*, v. 38, n. 11, p. 2698–2712, 5 fev. 2018.
- WANG, Z. et al. The resting-state functional connectivity of amygdala subregions associated with post-traumatic stress symptom and sleep quality in trauma survivors. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 12 fev. 2020.
- WONG, H. et al. Isoform-specific roles for AKT in affective behavior, spatial memory, and extinction related to psychiatric disorders. *eLife*, v. 9, 16 dez. 2020.
- XIONG, H. et al. mTOR is essential for corticosteroid effects on hippocampal AMPA receptor function and fear memory. *Learning & Memory*, v. 22, n. 12, p. 577–583, 16 nov. 2015.
- XUAN, S.-M. et al. mGluR5 in amygdala modulates fear memory generalization. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, v. 17, 20 fev. 2023.
- ZHANG, K. et al. Fear learning induces $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor-mediated astrocytic responsiveness that is required for memory persistence. *Nature Neuroscience*, v. 24, n. 12, p. 1686–1698, 1 dez. 2021.
- ZOU, Y.; LAUBICHLER, M. D. From systems to biology: A computational analysis of the research articles on systems biology from 1992 to 2013. *PLoS ONE*, v. 13, n. 7, 25 jul. 2018.