



**ESTUDO *IN SILICO* DA INTERAÇÃO DO Δ^9 -TETRAHIDROCANABINOL
COM PROCESSOS BIOLÓGICOS EM *Drosophila melanogaster* E *Homo sapiens***

**Gabrielle Nunes da Silva^{1,2}
Ana Paula de Souza²
Felipe Umpierre Conter³
Rafael Rodrigues Dihl^{2,4}**

Resumo: *Cannabis sativa* L. é uma espécie do gênero *Cannabis*, pertencente à família Cannabaceae. Possui uma grande quantidade de substâncias ativas chamadas canabinoides (CBs), dentre eles destacamos o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), o responsável pelos efeitos psicoativos atribuídos à *C. sativa*. *Drosophila melanogaster* é utilizada como organismo modelo para o estudo de processos moleculares, celulares e de desenvolvimento de doenças já que, 75% de seus genes possuem ortólogos em humanos, o que vem contribuindo ao longo dos anos para a melhor compreensão dos mecanismos que são conservados em seres humanos. Em razão disso, utilizamos a biologia de sistemas, uma ferramenta de bioinformática, para realizar uma caracterização inicial da forma como o THC poderia interagir com os sistemas biológicos da mosca da fruta e seres humanos. Redes de proteínas e THC foram fusionadas utilizando STITCH 5.0, STRING 11.0 e o software Cytoscape 3.5. Embora *D. melanogaster* não possua receptores CB1 e CB2, que são receptores canabinoides bem estabelecidos em humanos, foram identificados 112 nós e 888 conectores para o *D. melanogaster*. Uma rede composta por 136 nós e 2447 conectores para *Homo sapiens* também foi criada e, quando comparados os resultados de centralidades de ambas as redes, observamos que as seis proteínas, com maior valor dentro da rede (Hub-bottleneck), eram ortólogos entre os dois organismos de estudo. Desta maneira, os resultados mostram que o THC possui capacidade de interagir com proteínas relacionadas à receptores acoplados à proteína G, proteínas ribossomais e ainda ubiquitina tanto em *D. melanogaster* quanto em *H. sapiens*. Estes resultados apontam para a possibilidade de utilizar *D. melanogaster* como organismo experimental em estudos que envolvem a avaliação da toxicidade e genotoxicidade de canabinoides, como o THC, com um bom nível de extrapolação dos resultados para humanos.

Palavras-chave: Receptores canabinoides, THC, *Drosophila*, *Homo sapiens*, biologia de sistemas.

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA

² Laboratório da Toxicidade Genética (TOXIGEN), Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde), ULBRA.

³ PPGBioSaúde, ULBRA.

⁴ Professor Orientador do Curso de Ciências Biológicas e do PPGBioSaúde, ULBRA (rafael.rodrigues@ulbra.br)

Abstract: *Cannabis sativa* L. is a species of the genus *Cannabis*, belonging to the Cannabaceae family. It has a large amount of active substances called cannabinoids (CBs), among which we highlight Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), responsible for the psychoactive effects attributed to *C. sativa*. *Drosophila melanogaster* is used as a model organism for the study of molecular, cellular and disease development processes, since 75% of its genes have orthologous in humans, which has contributed over the years to a better understanding of the mechanisms that are conserved in humans. As a result, we use systems biology, a bioinformatics tool to perform an initial characterization of how THC could interact with the biological systems of the fruit fly and humans. Protein and THC networks were fused using STITCH 5.0, STRING 11.0 and Cytoscape 3.5 software. Although *D. melanogaster* does not have CB1 and CB2 receptors, which are well-established cannabinoid receptors in humans, 112 nodes and 888 edges were identified for *D. melanogaster*. A network composed of 136 nodes and 2447 edges for *Homo sapiens* was also created and, when comparing the results of centralities of both networks, we observed that the six proteins, with the highest value within the network (Hub-bottleneck), were orthologous among the two study species. In this way, the results show that THC has the ability to interact with proteins related to G protein-coupled receptors, ribosomal proteins and even ubiquitin in both *D. melanogaster* and *H. sapiens*. These results point to the possibility of using *D. melanogaster* as an experimental organism in studies that involve the evaluation of cannabinoid toxicity and genotoxicity, such as THC, with a good level of extrapolation of the results to humans.

Keywords: Cannabinoid receptors; THC; *Drosophila*; *Homo sapiens*; systems biology.

Introdução

Cannabis sativa L. (*C. sativa*) é uma espécie do gênero *Cannabis*, pertencente à família Cannabaceae e sua utilização ao longo da trajetória humana desde a fabricação de cordas com o uso do cânhamo até o uso medicinal como antiemético, anticonvulsivante, antibiótico, analgésico e estimulante de apetite remontam 2600 A.C, no continente Asiático. Possui uma grande quantidade de substâncias ativas chamadas canabinoides (CBs), dentre eles destacamos o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 tetrahydrocannabinol - Δ^9 THC, THC), que, embora apresente ação psicotrópica em humanos, vem sendo muito estudado por apresentar efeitos sobre doenças humanas. (BOW; RIMOLDI, 2016; KIM et al., 2019; LI, 1974; ZLEBNIK; CHEER, 2016).

O THC está presente na *C. sativa* como ácido tetrahydrocannabinólico e precisa da ação de calor para gerar o princípio ativo. Em humanos, o THC age nos receptores CB1, que são expressos no sistema nervoso central e periférico, mediando efeitos como ansiedade, paranoia, alterações perceptivas e déficit cognitivo e verbal. Já os efeitos imunológicos e anti-inflamatórios são mediados via receptores CB2, que são expressos principalmente nas linhagens linfóide, mieloide e monocítica, e no SNC encontra-se em menor proporção na microglia e região pós-sináptica (BABAYEVA et al., 2016; BOGGS et al., 2018; DEVANE et al., 1992; FRANCO; VIEGAS, 2017).

Drosophila melanogaster é um modelo genético adequado para o estudo de sistemas biológicos, uma vez que esta espécie apresenta processos moleculares, celulares, de desenvolvimento e de doenças que são conservados em seres humanos. Sequências de genes, relacionados a doenças humanas, são encontrados em *D.*

melanogaster. As vantagens do seu uso como modelo experimental são devido a: i) baixo custo de cultivo; ii) fácil manutenção de linhagens; iii) alta taxa de fecundidade; iv) ciclo de vida relativamente curto (KAUN; DEVINENI; HEBERLEIN, 2012; TOLWINSKI, 2017).

Popularmente conhecida como mosca da fruta, esse animal cosmopolita não se alimenta diretamente da fruta, mas sim de leveduras e bactérias que estão associados à fruta. Sofre metamorfose completa, da forma larval até o estado de adulto, esse desenvolvimento completo, em condições padrão laboratorial (temperatura em torno de 25°, 60% de umidade, alimentação e população controlada), leva em torno de 10 dias. Em condições naturais, as fêmeas tem o seu período de fecundidade atingido em aproximadamente 3 a 5 dias após a eclosão e podem depositar até 100 ovos por dia, essa taxa pode ser variável entre as fêmeas e em linhagens medidas em laboratório (FLATT, 2020).

Na literatura há relatos de ausência de receptores canabinoides CB1 e CB2 em *D. melanogaster*. Por outro lado, há relatos da existência de endocannabinoides na hemolinfa deste inseto (KHALIULLINA et al., 2015; SILVER, 2019). Gómez et al. (2019), avaliaram a função cardíaca de *D. melanogaster* após a inalação de uma cepa de *C. sativa* rica em THC. Foram observadas alterações nos cardiomiócitos. Este estudo, sugere que a mosca da fruta responde a fitocannabinoides por outras vias.

A biologia de sistemas é uma ferramenta de bioinformática cujo objetivo é compreender os sistemas biológicos em uma equivalência integral, visando a conexão dos componentes do sistema e atividade por meio de interações dependentes (ZHANG et al., 2008). Para isso, são construídas representações gráficas chamadas de rede, onde as partes individuais de um sistema são pontos chamados de nós e a conexão entre os nós é feita por conectores (FELTES et al., 2014). Assim, os fenômenos biológicos podem ser explicados com mais detalhes em cada componente funcional, além da construção de redes que expõe as interações existentes, descobrindo características não conhecidas no conjunto estudado (MESQUITA et al., 2015).

Uma vez que a *D. melanogaster* possui 75% de seu genoma relacionado com a expressão de genes de doenças em humanos, a mosca da fruta representa um importante organismo modelo para o estudo dos efeitos de canabinoides como forma de compreender melhor os mecanismos envolvidos nas ações biológicas relacionadas ao uso do THC. Desta maneira este trabalho teve como objetivo a realização de uma investigação *in silico* da interação do THC com proteínas de *D. melanogaster*, além de buscar possíveis alvos para avaliação de estudos genotóxicos e relacioná-las com a ação do mesmo com sistema biológico humano.

Materiais e Método

Rede de interação

A fim de procurar por interações conhecidas e previstas por evidências derivadas de experimentos, bancos de dados e literatura entre substâncias químicas e

proteínas, bem como interações entre proteínas, foram utilizadas as ferramentas de busca online STITCH 5.0 [<http://stitch.embl.de/>] (SZKLARCZYK et al., 2016) e STRING 11.0 [<http://string-db.org/>] (SZKLARCZYK et al., 2019). Primeiramente buscamos interações do THC com proteínas de *D. melanogaster* no STICH. As interações encontradas foram baixadas com base nos seguintes parâmetros: máximo de 50 interações, alto índice de confiança (0,400). No STRING utilizamos as proteínas obtidas anteriormente e as interações foram selecionadas conforme o seguinte parâmetro: máximo 50 interações diretas, 5 indiretas, alto índice de confiança (0,400).

Para a montagem da rede em humanos, foi utilizado o mesmo passo utilizado anteriormente no STITCH. A partir das proteínas obtidas no STRING da rede de *D. melanogaster* foi realizada uma pesquisa (<https://flybase.org/>) para identificar as proteínas ortólogas em *H. sapiens*. No STRING foram adicionadas as proteínas obtidas no STITCH com a adição das proteínas ortólogas e os dados baixados conforme a descrição anterior.

Foram montadas 2 redes, uma para humanos e outra para *Drosophila*. As diferentes sub-redes geradas a partir dessas triagens foram exportadas em formato tabular (.tsv) para o programa Cytoscape 8.0.0 e combinadas em uma única rede de interação metabólito-proteína empregando a função de união do *plug-in Merge Network*, uma plataforma para visualização, modelagem e análise de redes de interação molecular e genética.

Análise topológica global: avaliação de complexos moleculares na rede de interação metabólitos-proteínas

Para detectar as regiões que estão densamente conectadas em cada rede, foi utilizado o MCODE, uma ferramenta que sugere complexos proteicos funcionais chamados de módulos (clusters). As configurações foram: loops incluídos, *degree* cutoff 2, *haircut* ativado, *fluff* ativado, *kcore* 2.

Análise Ontológica de Genes

Uma vez calculadas as regiões com maior grau de conectividade, foi necessário compreender o processo biológico associado àquele módulo. Para tal, utilizamos o *plug-in* “rede biológica de ontologia gênica” (BiNGO), que mapeia os temas predominantes de um determinado gene na hierarquia de Ontologia Gênica (OG), um conjunto de classes que operam entre si levando em consideração os aspectos como componente celular, processo biológico e função molecular (RIVALS; LÉON PERSONNAZ; POTIER, 2007). O grau de enriquecimento funcional de um dado agrupamento e categoria foi avaliado quantitativamente (valor *p*) por distribuição hipergeométrica, seguido da aplicação de um teste de correção múltipla usando o algoritmo *false discovery rate* (FDR) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995), implementado no programa BiNGO. Os principais processos biológicos foram gerados após a correção de FDR com um nível de significância de 0,05.

Análise topológica local: avaliação dos nós centrais na rede de interação metabólito-proteína

Para identificar os nós mais relevantes na topologia global da rede, foi utilizado o *plug-in* CentiScaPe (SCARDONI et al., 2015). Nesse sentido, analisamos a relação do grau do nó (*node degree*) e intermedialidade (*betweenness*) em função do grau e intermedialidade da rede como um todo. Quanto mais interações um nó tiver, mais importante ele será para a rede e conseqüentemente, maior será o seu grau (*Degree*). Os nós que possuem o grau de centralidade maior que o grau de centralidade médio da rede são chamados de HUB. Já a intermedialidade é gerada a partir do parâmetro *betweenness* e corresponde ao caminho mais curto para a informação percorrer a rede. Nós com intermedialidade acima da média da rede são chamados de gargalo (*bottleneck- B*) e são responsáveis por servirem de ponte para que a informação percorra a rede de forma eficiente. Assim, o nó que apresenta maior grau e intermedialidade acima da média da rede recebe o nome de hub-gargalo (*Hub-bottleneck - HB*) (BARABÁSI; OLTVAI, 2004; YU et al., 2007).

Resultados e Discussão

Os resultados da rede de interações composto-proteína (CPI) apresentaram 112 nós e 888 conectores para o organismo *D. melanogaster* (**Figura 1a**) e uma rede composta por 136 nós e 2447 conectores para o organismo *H. sapiens* (**Figura 1b**). Para determinar a subestrutura da rede e demonstrar as regiões onde os grupos de nós estão altamente conectadas (*clusters*), utilizamos o *plug-in* MCODE. Com isso, foi possível visualizar a formação de 5 clusters acima do ponto de corte (score > 2) em ambas as redes (dados não mostrados). Para associar os *clusters* formados aos processos biológicos que cada um possui dentro da rede de cada organismo, a ontologia gênica (OG) foi realizada por meio do *plug-in* BiNGO e estão apresentadas na **Tabela 1**. Bioprocessos mais relevantes com o valor de *p* corrigido < 10⁻² que apresentaram similaridade entre os dois organismos estão presentes no cluster 1 (**Figura 2a**) da rede de *D. melanogaster* assim como no cluster 2 (**Figura 2b**) da rede para *H. sapiens*.

A partir das redes geradas, foi utilizado o *plug-in* CentiScaPe 2.2 para analisar a centralidade de cada rede (**Figura 3**). A rede de *D. melanogaster* apresentou um total 20 proteínas HB e a rede de *H. sapiens* 21 proteínas HB. A partir da análise da centralidade foi possível observar que seis proteínas HB da rede de *D. melanogaster* apresentavam ortólogos com 8 proteínas que também eram HB na rede de *H. sapiens* (**Tabela 2**). Dentre essas proteínas HB em comum aos dois organismos, foram encontradas proteínas pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G, proteínas ribossomais e proteínas da família da ubiquitina.

Tabela 1. Bioprocessos específicos derivados de interações proteína-proteína observadas no cluster 1 em *D. melanogaster* e no cluster 2 em *H. sapiens*.

	Código	P corrigido	Bioprocesso	Genes
<i>Drosophila melanogaster</i>	7202	9,87E-03	Ativação da atividade da fosfolipase C	OAMB GBETA76C 5-HT1A 5-HT1B
	7187	5,38E-03	Sinalização da proteína G, acoplada ao segundo mensageiro nucleotídico cíclico	5-HT7 5-HT1A 5-HT1B OCTBETA1R
	50789	3,42E-04	Regulação de processo biológico	ARPC3B CG30340 GPRK1 CG32683 ARPC3A OAMB PI3K68D RAS85D EPS-15 GALPHAS GGAMMA30A GALPHAI ARR1 EGFR ARR2 MGLUR KRZ 5-HT7 SHI PKA-C1 5-HT1A 5-HT1B OCTBETA1R RPS27A GPRK2 BETACOP RPL40 GBETA76C TRE1 GABA-B-R2 UBI-P63E OCTBETA2R
	51339	2,16E-02	Regulação da atividade da liase	5-HT7 GALPHAS 5-HT1A 5-HT1B
	19933	1,57E-03	Sinalização mediada por cAMP	5-HT7 PKA-C1 5-HT1A 5-HT1B OCTBETA1R
<i>Homo sapiens</i>	7165	8,16E-28	Transdução de sinal	CHRM3 CHRM1 NPY2R CHRM5 HTR2B ADCY4 HTR2C ADCY3 ADCY2 HTR2A ADCY1 ADRA1B HTR4 ADCY8 ADRA1A ADCY7 GNAI1 ADCY5 HTR7 CKAR CNR2 GALR2 HRH2 CNR1 AKT1 MAPK1 DRD1 DRD2 HRAS DRD5 M APK3 HTR1A SSTR1 NMBR SSTR2 SSTR3 GNG13 MTNR1A ADCY9 GNAL M TNR1B ADORA2B GNB1 GNAS NMUR2 NMUR1 GNB5 RAF1
	7200	4,32E-12	Ativação da atividade da fosfolipase C pela via de sinalização da proteína receptora acoplada à proteína G acoplada ao segundo	CHRM1 CCKAR GNB1 NMUR2 NMUR1 HTR2A DRD1 NMBR DRD2 DRD5 G NG13

mensageiro IP3

10578	3,75E-21	Regulação de atividade de adenilato ciclase envolvida na via de sinalização de Proteína G	ADCY4 ADCY3 ADCY2 ADCY1 ADCY8 ADCY7 ADCY5 HTR7 ADCY9 GNAL ADORA2B GALR2 GNAS DRD1 DRD5
10863	2,77E-12	Regulação positiva de atividade da fosfolipase C	CHRM1 CCKAR GNB1 NMUR2 NMUR1 HTR2A DRD1 NMBR DRD2 ADRA1A DRD5 GNG13
7193	2,70E-21	Inibição da atividade de adenilato ciclase por via de sinalização de proteína G	NPY2R CHRM5 ADCY4 HTR1A ADCY3 ADCY2 ADCY1 SSTR2 ADCY8 ADCY7 GNAI1 ADCY5 ADCY9 GNAL DRD2
6874	1,97E-05	Homeostase celular do íon Cálcio	CCKAR GALR2 GNB1 HTR2B HTR2C NMUR2 HTR2A DRD1 DRD2 ADRA1A DRD5
45859	1,64E-06	Regulação da atividade de proteína quinase	CHRM1 HTR2B ADCY4 ADCY3 ADCY2 HTR2A ADCY1 ADCY8 ADCY7 ADCY5 ADCY9 ADORA2B AKT1 DRD1 DRD5
7188	1,52E-31	Sinalização da proteína G, acoplada ao segundo mensageiro do nucleotídeo cAMP	NPY2R CHRM5 ADCY4 HTR1A ADCY3 ADCY2 ADCY1 ADRA1B SSTR2 ADCY8 ADRA1A ADCY7 GNAI1 ADCY5 HTR7 ADCY9 GNAL ADORA2B GALR2 GNAS DRD1 DRD2 DRD5

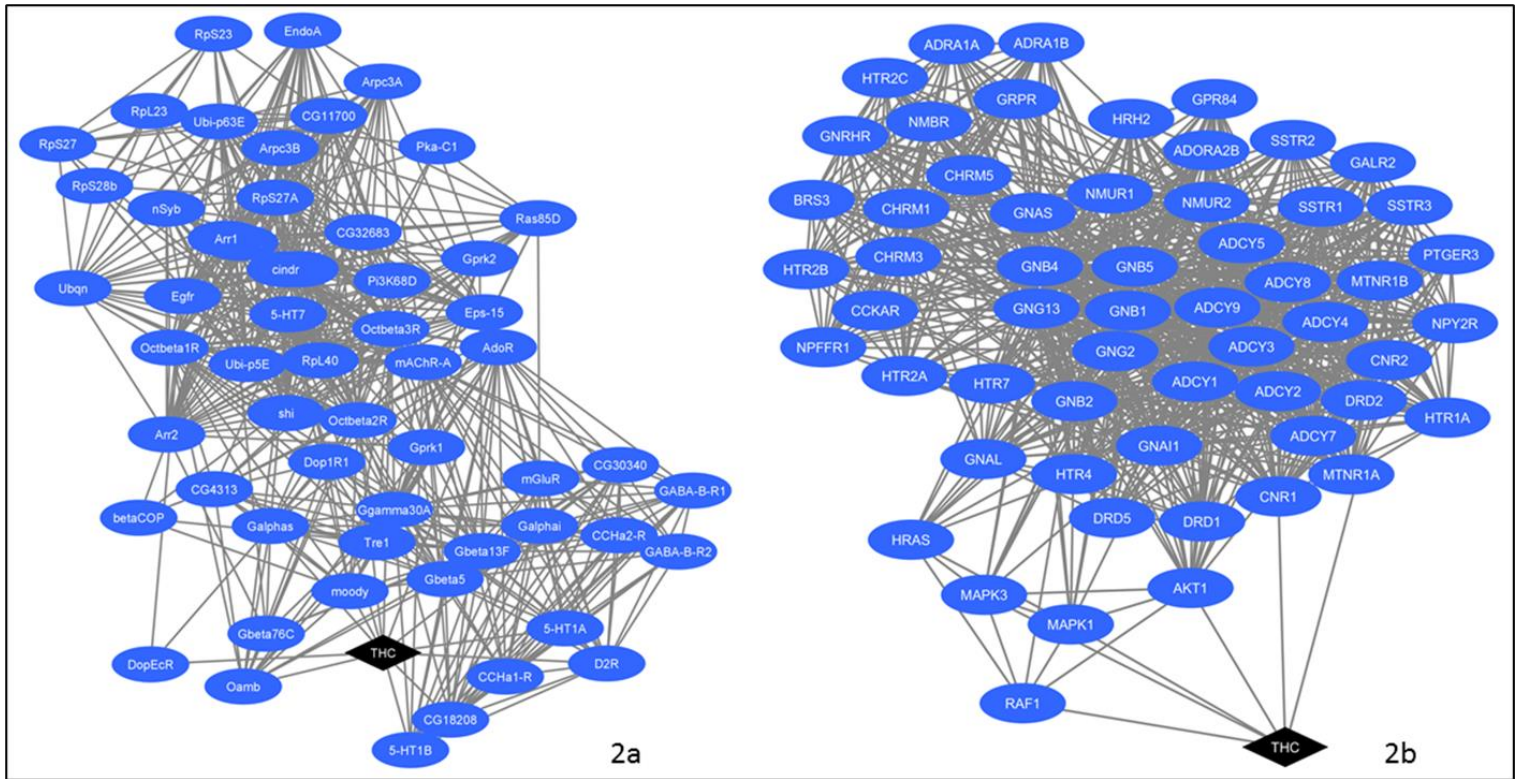


Figura 2 - Clusters gerados a partir do plug-in MCode. O cluster 2a refere-se a *D. melanogaster* e o 2b a *H. sapiens*.

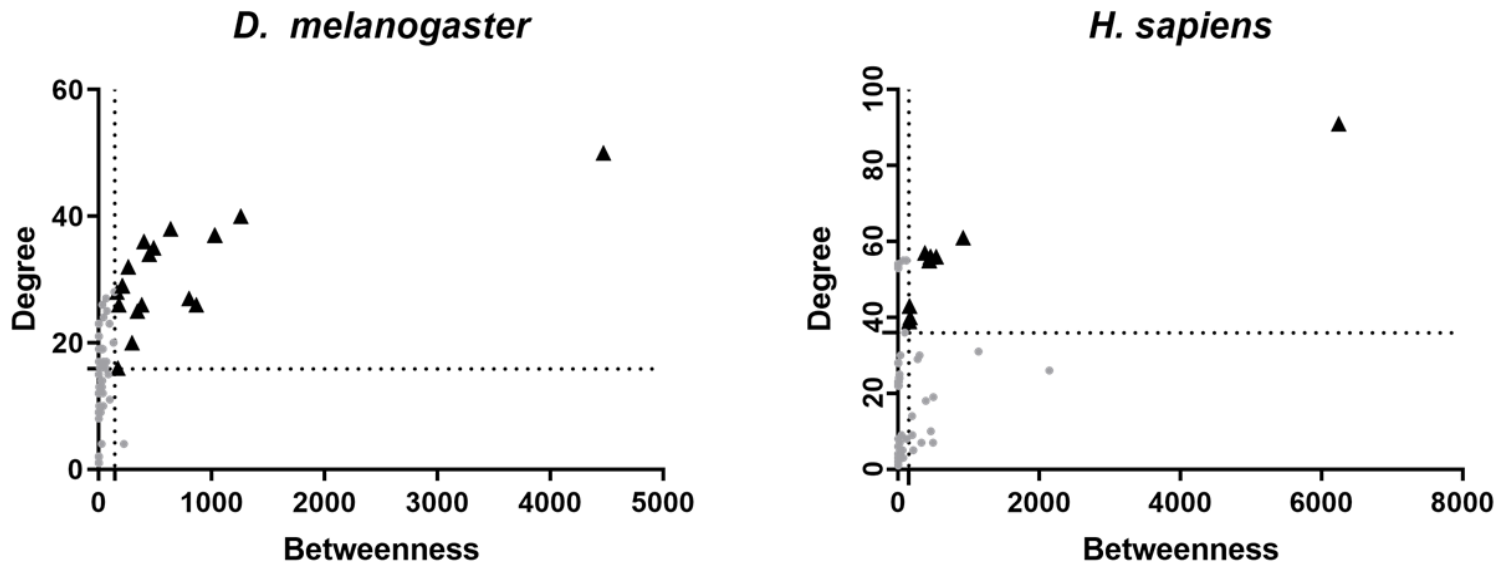


Figura 3 - Gráfico representando os nós *Hub-Bottleneck* para *D. melanogaster* e *H. sapiens*. Os eixos verticais e horizontais demonstram o grau do nó e a intermedialidade dos nós, respectivamente. A linha pontilhada representa os valores médios dos nós da rede. Os nós acima da média representam proteínas HB e estão representados pelos pontos pretos triangulares. Os pontos cinzas são nós presentes na rede e que apresentaram resultados abaixo da média.

Tabela 2. Descrição das proteínas HB em comum em ambas as redes.

Família de proteínas	<i>D. melanogaster</i>			<i>H. sapiens</i>		
		<i>Betweenness</i>	<i>Degree</i>		<i>Betweenness</i>	<i>Degree</i>
GPCR	GBETA13F	486.35	35.0	GNB1	460.80	56.0
	GBETA5	162.00	28.0	GNB2	538.69	56.0
	GGAMMA30A	263.21	32.0	GNB4	441.00	55.0
				GNB5	441.00	55.0
				GNG13	460.80	56.0
Ribossomais	RPS27A	210.75	29.0	RPS27A	922.52	61.0
	RPL40	210.75	29.0			
Ubiquitina	UBI-P63E	210.75	29.0	UBA52	607.94	60.0
				UBC	669.80	56.0

A família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR- *G-protein-coupled receptors*) compreendem mais de 800 receptores com 7 domínios transmembrana que estão envolvidos na regulação de sinalização da percepção olfativa, metabolismo, proliferação celular, sistema endócrino, regulação neuromuscular e sistema nervoso central de humanos. Em *D. melanogaster* há mais de 200 receptores, que assim como em humanos, também estão envolvidos na sinalização quimiossensorial, sistema endócrino, sistema nervoso e proliferação celular (HANLON; ANDREW, 2015; ZHOU; MELCHER; XU, 2017).

Quando um agonista se liga ao lado extracelular da GPCR ocorre uma mudança conformacional no domínio transmembrana que leva a ativação das proteínas G heterotriméricas de ligação a nucleotídeos de guanina, composta por subunidades $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$. As proteínas HB encontradas na análise de nossa rede compreendem as proteínas $G\beta 13F$ e $GN\beta 5$ de *D. melanogaster* assim como as proteínas $GNB1$, $GNB2$, $GNB4$ e $GNB5$ para a rede de *H. sapiens*. Essas proteínas ortólogas entre os dois organismos fazem parte do mesmo tipo de complexo $G\alpha$ - $G\beta$ - $G\gamma$, proteínas chaves para a transdução de sinal via GPCR (DUC; KIM; YOUNG, 2015; LOHMANN et al., 2017; ZHOU; MELCHER; XU, 2017). Em humanos, existem 12 $G\alpha$, 6 $G\beta$ e 12 $G\gamma$ e em *Drosophila*, existem 9 $G\alpha$, 3 $G\beta$ e 1 $G\gamma$ que se combinam criando diferentes complexos heterotriméricos associados a várias funções diferentes em cada tipo de célula (HANLON; ANDREW, 2015; ZHOU; MELCHER; XU, 2017).

Também pertencente à GPCR e presente como HB na rede de *Drosophila*, a proteína GGAMMA30A ($G\gamma 30A$) é expressa no cérebro, em células fotorreceptoras, além dos receptores olfativos (antenas e palpos maxilares) (ANDREA YAO; CARLSON, 2010; BOTO; GOMEZ-DIAZ; ALCORTA, 2010). Seu ortólogo HB na rede de *H. sapiens*, GNG13, é expresso em células receptoras do paladar, encontra-se localizado junto com a gustducina, sendo responsáveis pela percepção de sabor amargo e doce (LI et al., 2019; XIONG et al., 2019).

Além dos receptores canabinoides conhecidos CB1 e CB2, ainda há o GPR55, receptor canabinoide que também é acoplado à proteína G. Os receptores CB1 e CB2 são pertencentes ao clado Rodopsina, subfamília da GPCR. Esses receptores inibem a atividade da adenilil ciclase (AC) e diminuem o acúmulo de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). A ativação de adenilato ciclase, enzima que catalisa a formação de AMPc à partir de trifosfato de adenosina (ATP), um segundo mensageiro responsável pela sinalização interna de controle de metabolismo celular, é iniciada através da ativação das GPCRs (DE MOURA; PINTO VIDAL, 2011). GPR55 possui baixa homologia com CB1 e CB2, porém interage com vários canabinoides, incluindo o THC, podendo ser responsável pelos efeitos advindos de ligantes endógenos, vegetais ou sintéticos, quando esses não são dos canabinoides clássicos (TUDURÍ et al., 2017; YANG; ZHOU; LEHMANN, 2016).

A interação do THC com proteínas ribossomais foi evidenciada com as proteínas HB RPS27A na rede para *H. sapiens* e RPS27A e RPL40 para rede de *D. melanogaster*. Essas proteínas ribossomais tem como principal função o envolvimento

na tradução, já que é responsável pela leitura do RNA mensageiro (RNAm) catalisando a síntese de proteínas. Porém, existem funções extra ribossomais desempenhadas por este grupo de proteínas como regulação de apoptose, parada no ciclo celular, proliferação, migração, invasão celular e ainda estão envolvidos no reparo de DNA, o que faz destas proteínas importantes alvos para o tratamento de diversas doenças (JI et al., 2019; WANG et al., 2016; WARNER; MCINTOSH, 2009).

RPS27A (proteína ribossômica S27a) é um componente da subunidade 40S dos ribossomos, codificado pelo gene *RPS27A*, e sabe-se que pode regular p53, um importante supressor tumoral que é ativado para promover a parada no ciclo celular ou induzir apoptose em situações de estresse celular. Uma vez que p53 possui a capacidade de responder à diversos insultos celulares, como danos no DNA, sob condições de estresse, pode inclusive ativar a transcrição direta do gene *RPS27A* e com isso aumentar a expressão da proteína RPS27A. Esse aumento vai atuar como um amplificador da resposta de p53 ao controle de ciclo celular e com isso, o eixo p53-RPS27A poderia ser um sistema de resposta a estresse celular (NOSRATI; KAPOOR; KUMAR, 2015). Porém, estudos prévios demonstraram que a superexpressão da proteína RPS27A em pacientes com Leucemia Mieloide Crônica (LMC) (WANG et al., 2014), câncer colorretal (WONG et al., 1993), câncer gástrico (TIAN; JU; YANG, 2019); câncer de rins, assim como no câncer de mama contribuem para o aumento da proliferação e migração das células tumorais e também supre a indução de apoptose. Outro estudo demonstrou que a superexpressão de STAT3 e RPS27A na LMC contribui para a resistência ao tratamento com Imatinib, principal medicamento para o tratamento da LM (WANG et al., 2016). Estes achados sugerem que a RPS27A pode ser um importante alvo para o tratamento do câncer.

RPL40A (proteína ribossômica L40) está envolvida no processo catabólico de ubiquitinação de proteínas. Proteínas ribossomais são sujeitas a modificações pós-tradução como a ubiquitinação, um processo que regula a maioria das vias celulares. Essa regulação consiste em uma ligação covalente de uma molécula de ubiquitina (UB) com o substrato de outra proteína e é realizada por enzimas de diferentes classes: E1 – ativadoras de ubiquitina, E2 – conjugadoras de ubiquitina e E3 – ligases de ubiquitina. Pode ocorrer nos resíduos de Lisina, Serina e em terminais N das proteínas (ABED; BITMAN-LOTAN; ORIAN, 2018; RISTIC et al., 2016).

Outra classe de proteínas que se apresentaram HB são as proteínas da família da Ubiquitina (UB). UBC e UB52 são HB na rede de *H. sapiens* e UBI-P63E foi uma proteína HB na rede de *Drosophila* e, de acordo com banco de dados específicos para cada organismo, FlyBase e GeneCards, é uma proteína extremamente conservada em eucariotos sendo a UB de *Drosophila* idêntica à de humanos. Com 76 aminoácidos, a UB pode ser encontrada livre ou covalentemente ligada à outra proteína. Sua principal função é a modificação da atividade de diferentes proteínas sendo uma das principais vias de degradação de protossoma. UBA52 é uma proteína ubiquitina fundida no terminal C com as proteínas RPL40. Quando ocorre a clivagem da ubiquitina de UBA52, a UB livre forma um complexo proteico ribossômico com RPL40, influenciando na biogênese ribossomal. Sabe-se que as ubiquitinas atuam na regulação

da tradução e desempenham um papel importante na produção de proteínas, incluindo aquelas relacionadas ao ciclo celular, como as CDKs, e ainda, a regulação negativa da ubiquitina parece ser um alvo potencial para o tratamento do câncer, já que as células tumorais utilizam estas proteínas como um sistema de apoio para tolerar o estresse gerado por inúmeras mutações (KOBAYASHI et al., 2016; NGUYEN et al., 2019; OH et al., 2013).

O THC demonstrou interação direta e indireta com as proteínas citadas anteriormente nas análises realizadas em ambos os organismos. Embora os principais efeitos do THC sejam atribuídos à ligação com receptores do tipo CB, Carroll et al. (2012) demonstraram a ação do THC na mediação de morte celular, apoptose e estresse oxidativo em células neuronais, por meio de outros receptores, que não os CBs.

Conclusão

A busca por melhor compreensão dos efeitos que substâncias derivadas de plantas são capazes de causar no organismo humano é uma área de estudo importante e faz-se cada vez mais necessária, principalmente na busca por novos candidatos a fármacos.

Em razão da homologia genética, a *D. melanogaster* é o organismo modelo invertebrado mais proximamente relacionado com humanos (BIER, 2005). Adicionalmente, a alta sensibilidade à substâncias tóxicas faz de *D. melanogaster* um excelente organismo para o estudo da toxicidade de compostos, motivo pelo qual tem sido utilizada em bioensaios, em substituição ao uso de vertebrados.

Os resultados deste estudo demonstraram a interação entre o THC e proteínas de *D. melanogaster*. Algumas proteínas HB da rede de *D. melanogaster* apresentavam ortólogos que também eram HB na rede de *H. sapiens*. Estes resultados apontam para a possibilidade de utilizar *D. melanogaster* como organismo experimental em estudos que envolvem a avaliação da toxicidade e genotoxicidade de canabinoides, como o THC, com um bom nível de extrapolação dos resultados para humanos.

Referências

ABED, M.; BITMAN-LOTAN, E.; ORIAN, A. The biology of SUMO-targeted ubiquitin ligases in Drosophila development, immunity, and cancer. **Journal of Developmental Biology**, v. 6, n. 1, 2018.

ANDREA YAO, C.; CARLSON, J. R. Role of G-proteins in odor-sensing and CO₂-sensing neurons in Drosophila. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 13, p. 4562–4572, 2010.

BABAYEVA, M. et al. Marijuana Compounds: A Nonconventional Approach to Parkinson's Disease Therapy. **Parkinson's Disease**, v. 2016, 2016.

- BARABÁSI, A. L.; OLTVAI, Z. N. Network biology: Understanding the cell's functional organization. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 2, p. 101–113, 2004.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.
- BIER, E. Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 1, p. 9–23, 2005.
- BOGGS, D. L. et al. Clinical and Preclinical Evidence for Functional Interactions of Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 1, p. 142–154, 2018.
- BOTO, T.; GOMEZ-DIAZ, C.; ALCORTA, E. Expression analysis of the 3 G-protein subunits, $G\alpha$, $G\beta$, and $G\gamma$, in the olfactory receptor organs of adult *Drosophila melanogaster*. **Chemical Senses**, v. 35, n. 3, p. 183–193, 2010.
- BOW, E. W.; RIMOLDI, J. M. The structure-function relationships of classical cannabinoids: CB1/CB2 modulation. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 17–39, 2016.
- CARROLL, C. B. et al. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) exerts a direct neuroprotective effect in a human cell culture model of Parkinson's disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 38, n. 6, p. 535–547, 2012.
- DE MOURA, P. R.; PINTO VIDAL, F. A. Signal transduction: A review about G protein. **Scientia Medica**, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2011.
- DEVANE, W. A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 1992.
- DUC, N. M.; KIM, H. R.; YOUNG, K. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 763, p. 214–222, 2015.
- FELTES, B. C. et al. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. Porto Alegre: [s.n.].
- FLATT, T. Life-history evolution and the genetics of fitness components in *drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 214, n. 1, p. 3–48, 2020.
- FRANCO, G. R. R.; VIEGAS, C. The contribution of studies with cannabidiol and synthetic analogues in the design of new drug candidates for neuropsychiatric disorders and neurodegenerative diseases. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1773–1798, 2017.
- GOMEZ, I. M. et al. Inhalation of marijuana affects *drosophila* heart function. **Biology Open**, v. 8, n. 8, p. 1–7, 2019.

- HANLON, C. D.; ANDREW, D. J. Outside-in signaling - A brief review of GPCR signaling with a focus on the Drosophila GPCR family. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 19, p. 3533–3542, 2015.
- Ji, Z. et al. Drosophila RpS12 controls translation, growth, and cell competition through Xrp1. **PLoS Genetics**, v. 15, n. 12, p. 1–25, 2019.
- KAUN, K. R.; DEVINENI, A. V.; HEBERLEIN, U. Drosophila melanogaster as a model to study drug addiction. **Human Genetics**, v. 131, n. 6, p. 959–975, 2012.
- KHALIULLINA, H. et al. Endocannabinoids are conserved inhibitors of the Hedgehog pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. 3415–3420, 17 mar. 2015.
- KIM, S. H. et al. A Review on Studies of Marijuana for Alzheimer ' s Disease – Focusing on CBD , THC. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 22, n. 4, p. 225–230, 2019.
- KOBAYASHI, M. et al. The ubiquitin hybrid gene UBA52 regulates ubiquitination of ribosome and sustains embryonic development. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–11, 2016.
- LI, H.-L. An Archaeological and Historical Account of Cannabis in China. **Economic Botany**, v. 28, n. 4, p. 437–448, 1974.
- LI, W. C. et al. Identification of differentially expressed genes in hip cartilage with femoral head necrosis, based on genome-wide expression profiles. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 3, p. 2073–2082, 2019.
- LOHMANN, K. et al. Novel GNB1 mutations disrupt assembly and function of G protein heterotrimers and cause global developmental delay in humans. v. 26, n. 6, p. 1078–1086, 2017.
- MESQUITA, E. T. et al. The Paradigm of Systems Biology Applied to Cardiovascular Diseases. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 1, n. 1, p. 78–86, 2015.
- NGUYEN, N. N. et al. Proteasome $\beta 5$ subunit overexpression improves proteostasis during aging and extends lifespan in Drosophila melanogaster. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- NOSRATI, N.; KAPOOR, N. R.; KUMAR, V. DNA damage stress induces the expression of ribosomal protein S27a gene in a p53-dependent manner. **Gene**, v. 559, n. 1, p. 44–51, 2015.
- OH, C. et al. Downregulation of ubiquitin level via knockdown of polyubiquitin gene Ubb as potential cancer therapeutic intervention. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–9, 2013.

- RISTIC, G. et al. USP5 is dispensable for monoubiquitin maintenance in drosophila. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 17, p. 9161–9172, 2016.
- RIVALS, I.; LÉON PERSONNAZ, L. T.; POTIER, M.-C. Databases and ontologies Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes : which test ? **Bioinformatics**, v. 23, n. 4, p. 401–407, 2007.
- SCARDONI, G. et al. Biological network analysis with CentiScaPe : centralities and experimental dataset integration. **F100Research**, v. 3, p. 1–9, 2015.
- SILVER, R. J. The Endocannabinoid System of Animals. **Animals**, v. 9, n. 9, p. 686, 2019.
- SZKLARCZYK, D. et al. STITCH 5: Augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D380–D384, 2016.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 2019.
- TIAN, X.; JU, H.; YANG, W. An ego network analysis approach identified important biomarkers with an association to progression and metastasis of gastric cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 9, p. 15963–15970, 2019.
- TOLWINSKI, N. S. Introduction: Drosophila-A model system for developmental biology. **Journal of Developmental Biology**, v. 5, n. 9, p. 10–11, 2017.
- TUDURÍ, E. et al. Gpr55: A new promising target for metabolism? **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 58, n. 3, p. R191–R202, 2017.
- WANG, H. et al. RPS27a promotes proliferation, regulates cell cycle progression and inhibits apoptosis of leukemia cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 446, n. 4, p. 1204–1210, 2014.
- WANG, H. et al. Overexpression of RPS27a contributes to enhanced chemoresistance of CML cells to imatinib by the transactivated STAT3. **Oncotarget**, v. 7, n. 14, p. 18638–18650, 2016.
- WARNER, J. R.; MCINTOSH, K. B. How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? **Molecular Cell**, v. 34, n. 1, p. 3–11, 2009.
- WONG, J. M. et al. Ubiquitin-Ribosomal Protein S27a Gene Overexpressed in Human Colorectal Carcinoma Is an Early Growth Response Gene. **Cancer Research**, v. 53, n. 8, p. 1916–1920, 1993.
- XIONG, Y. et al. MEF2A alters the proliferation, inflammation-related gene expression profiles and its silencing induces cellular senescence in human coronary endothelial cells. **BMC Molecular Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2019.

YANG, H.; ZHOU, J.; LEHMANN, C. GPR55 - A putative “type 3” cannabinoid receptor in inflammation. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 297–302, 2016.

YU, H. et al. The importance of bottlenecks in protein networks: Correlation with gene essentiality and expression dynamics. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 4, p. 713–720, 2007.

ZHANG, M. et al. Interactive analysis of systems biology molecular expression data. **BMC Systems Biology**, v. 2, p. 1–14, 2008.

ZHOU, X. E.; MELCHER, K.; XU, H. E. Understanding the GPCR biased signaling through G protein and arrestin complex structures. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 45, p. 150–159, 2017.

ZLEBNIK, N. E.; CHEER, J. F. Beyond the CB1 Receptor: Is Cannabidiol the Answer for Disorders of Motivation? **Annual Review of Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 1–17, 2016.